Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin - Neukölln
Chefärztin Professor Dr. med. I. Boll

# Die Einwirkung von 0,25 µg/ml Corticosteron und 0,25 µg/ml Hydrocortison auf menschliches Knochenmark in vitro.

**Inaugural-Dissertation**
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
**Glöckler, Clemens**
aus Berlin

1976

Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin - Neukölln
Chefärztin Professor Dr. med. I. Boll

# Die Einwirkung von 0,25 µg/ml Corticosteron und 0,25 µg/ml Hydrocortison auf menschliches Knochenmark in vitro.

**Inaugural-Dissertation**
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
**Glöckler, Clemens**
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. I. Boll

Korreferent: Prof. Dr. med. H. Michel

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereich der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 17. August 1976

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei, V a A 4

Inhaltsübersicht


| | Seite |
|---|---|
| EINLEITUNG | 4 |
| FRAGESTELLUNG | 9 |
| METHODE UND ARBEITSGANG | 10 |
| ERGEBNISSE | 14 |
| STATISTISCHE AUSWERTUNG | 56 |
| ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE | 66 |
| DISKUSSION | 69 |
| ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT | 73 |
| LITERATURVERZEICHNIS | 74 |

## E I N L E I T U N G

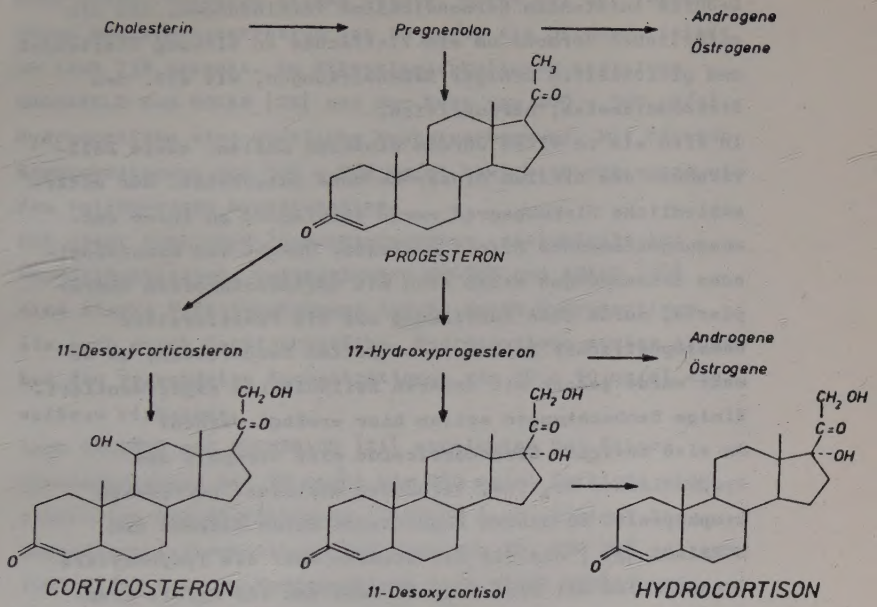
Die Entdeckung der Nebennierenrindenhormone verdanken wir dem Bestreben, die Funktion der Nebenniere aufzudecken.
ADDISON [1] 1855 war der Erste, der die Symptome eines Nebennierenrindenausfalls im Zusammenhang sah und dadurch den Anstoß zur intensiven Erforschung der Nebennierenfunktion gab.

Aufgrund von Tierversuchen gelangten BIEDL [5] 1913, HOUSSAY und LEWIS [27] 1923, sowie SWINGLE [48] 1927 zu der Überzeugung, daß der Tod adrenalectomierter Versuchstiere nicht auf den Mangel an Adrenalin (entdeckt 1900), sondern auf das Fehlen von Rindenhormon zurückzuführen sei. SWINGLE und PFIFFNER 1929 zeigten zuerst, daß man adrenalectomierte Katzen mit einem Alkohol- Benzol-Extrakt aus Nebennierenrindensubstanz am Leben erhalten kann.

1931 beschrieben sie die Herstellung dieser Extrakte [47], so daß die Synthese des ersten NNR-Hormons in greifbare Nähe rückte. Die ersten Entdeckungen, die die chemische Struktur der NNR-Hormone betrafen, wurden fast gleichzeitig in drei Laboratorien gemacht: Durch KENDALL an der Mayo-Klinik in Rochester, REICHSTEIN in Zürich und WINTERSTEINER in New York.

1936 isolierten REICHSTEIN und LAQUEUR [38] das erste wirksame NNR-Hormon und bezeichneten diese Substanz als Corticosteron. Aus der Nebennierenrinde wurden bis heute über 50 hormonwirksame Verbindungen isoliert, von denen Corticosteron 1936, Desoxycorticosteron (Cortexon) 1938 und schließlich Cortison 1939 erwähnt seien.

Alle Hormone der Nebennierenrinde: Glucocorticoide, Mineralocorticoide und Androgene sind ausnahmslos Steroidhormone und lassen sich vom Progesteron ( $\Delta^4$-Pregnen-3,20-dion\ ableiten.




Eine Gesetzmäßigkeit bei der Entstehung der NNR-Hormone ist dadurch gegeben, daß spezifische Hydroxylasen das Sterangerüst des Progesterons an den Positionen 11,17,18, 21 hydroxylieren.

Die Tatsache, daß Glucocorticoide bei weitaus höheren Konzentrationen als sie der physiologischen Produktion (10-20 mg/24 Std Cortisol bzw. 3 mg/24 Std Corticosteron) entsprechen, neben der Beeinflussung des Kohlehydratstoffwechsels auch einen entzündungshemmenden Effekt, sowie eine immunsuppressive Wirkung zeigen, wurde schon früh erkannt.

So behandelte 1948 HENCH [25] als erster an rheumatischer Arthitis erkrankte Patienten erfolgreich mit Cortison. Eine Schlüsselstellung in der klinischen Therapie eroberten die Glucocorticoide, als es den Chemikern gelang,

synthytische Substituenten in das Sterangerüst einzufügen. Dadurch entstanden hormonwirksame Verbindungen, die die natürlichen Hormone um ein Vielfaches an Wirkung übertrafen und gleichzeitig weniger Nebenwirkungen, wie z.B. den Steroiddiabetes, hervorriefen.

In vivo wie in vitro wurden einzelne Zellen, sowie Zellverbände dem Einfluß dieser Hormone ausgesetzt. Der unterschiedliche Wirkungsgrad wurde vorwiegend an ihrem entzündungshemmenden Effekt gemessen. Obwohl man hämatologische Erkrankungen schon früh mit Corticosteroiden therapierte, wurde ihre Auswirkung auf die Proliferation hämatopoetischer Zellen recht selten beschrieben, um so mehr wurde jedoch mit anderen Zellkulturen experimentiert. Einige Beobachtungen sollen hier erwähnt werden:

In vivo bewirken Glucocorticoide eine Atrophie des lymphatischen Gewebes, verbunden mit einer peripheren Lymphopenie. Zu diesen Ergebnissen kamen BASERGA und MORSIANI [2] , als sie bei Studien über die lymphozytäre Regeneration bei Mäusen durch Gabe von 180 mg/die Prednisolon eine experimentelle Atrophie erzeugten. BATRA, KARAM, LLOYD und R. SCHREK [3] erzielten einen deutlich lebensverkürzenden Effekt an menschlichen Lymphozyten. Man kultivierte die Zellen zwischen ein und sieben Tagen mit 10 µg Prednisolon und gab die überlebenden Zellen in Prozent der Original-Lymphozytenzahl an: In den Zusatzkulturen überlebten nur 35,7 % gegenüber 51,4 % in den Kontrollen. TROWELL [53] kultivierte Lymphknoten von jungen Ratten und zählte nach zweitägiger Versuchsdauer die pyknotischen Lymphknoten. Dabei wirkten 0,1 µg/ml Cortison stark lymphotoxisch; denn es wurden 45 % der Lymphozyten gegenüber 1 - 2 % in den Kontrollkulturen abgetötet. An aus dem Rattenthymus isolierten Zellen erzielte SCHREK [43] ebenfalls einen ausgeprägt zytotoxischen Effekt mit Corticosteron. Proportional zu steigenden Prednisolonzusätzen sah NOWELL [34] eine Regenerationshemmung bei in-vitro-Versuchen mit menschlichen Blutlymphozyten. Während der geringste Zusatz von 0,002 µg/ml nach dreitägiger

Inkubation auf die Stimulation durch Phytohämagglutinin noch keinen meßbaren Effekt zeigte, wurde bei der verwendeten Höchstkonzentration von 10 µg/ml die Mitoseaktivität um fast 75% gesenkt. An Fibroblastenkulturen erzielten GROSSFELD und ROGAN [22] bei der Gabe von 200 - 300 µg/ml Hydrocortison eine deutliche Wachstumshemmung. Mit höheren Konzentrationen von 400 - 500 µg/ml bewirkten sie sogar einen vollkommenen Wachstumsstop.
Mit einer ähnlichen Versuchsanordnung, gleichfalls bei Mäusefibroblasten, verzeichneten HOLDEN und ADAMS [26] eine starke Wachstumshemmung sowohl durch Hydrocortison als auch durch Cortisonzusätze. Hydrocortison erwies sich bei den verwendeten Konzentrationen von 10 - 50 µg/ml als weitaus wirksamer.
Auch GILETTE und BUCHSBAUM [21] erreichten bei Fibroblastenkulturen mit 30 µg/ml bis 240 µg/ml Cortison eine eindeutige Wachstumshemmung. TAIFOUR A.-H. [49] sah an Mäusefibroblastenkulturen bei Gabe von 10, 100 und 1000 µg/ml Dehydro-Hydrocortison eine stark wachstumshemmende Wirkung, die linear zur Dosis anstieg.
Bei der Gabe von nur 20 µg/ml Hydrocortison sowie Cortison stellen HOLDEN und ADAMS [26] keinen Rückgang der Mitoserate, folglich eine unbeeinflußte Regeneration bei Fibroblastenkulturen fest. Die Proliferation wurde nach FARNES und BARKER [16] sogar deutlich gesteigert, nachdem sie menschliche Fibroblasten sechs Tage mit Prednisolon-Konzentrationen von 0,5 bis 50 µg/ml kultiviert hatten.

Eine Proliferationsförderung der Granulopoese unter Prednisoloneinfluß konnte BOLL [6] in vitro bei einer relativ hohen Konzentration von 250 µg/ml nachweisen. Geringere Dosen von 25 µg/ml, 2,5 µg/ml und 0,25 µg/ml bewirkten zwar bis zu 24 Stunden eine verstärkte Regeneration, die jedoch an den beiden nachfolgenden Kulturtagen nicht mehr nachzuweisen war. Noch bei einem Zusatz von 0,25 µg/ml Dexamethasonsulfat beobachtete G.WILDE [58] gleichfalls eine Proliferationsförderung, vorwiegend der

Erythropoese. Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangte A. SCHELLACK [42] mit 0,25 µg/ml Prednisolonsulfat.

Im Gegensatz dazu wurde nach WEISSENFELS und BOLL [57] die Proliferation des menschlichen Knochenmarks in vitro mit 0,25 µg/ml Triamcinolon bzw. Prednisolonacetat gehemmt, wobei jeweils die Erythropoese stärker beeinflußt war als die Granulopoese.

## F R A G E S T E L L U N G :

Wie aus der Einleitung hervorgeht, gelangte man bei der Erforschung der Corticosteroidwirkung auf die Zellproliferation allgemein, aber auch speziell auf die der Hämatopoese zu unterschiedlichen, in einigen Fällen sogar zu scheinbar gegensätzlichen Ergebnissen.
In dieser Arbeit soll nun untersucht werden, wie sich die Proliferation in menschlichen Knochenmarkkulturen unter der direkten Einwirkung von 0,25 µg/ml Corticosteron bzw. 0,25 µg/ml Hydrocortison qualitativ und quantitativ verändert. Obwohl Corticosteron und Hydrocortison, gemessen an ihrem entzündungshemmenden Effekt, weitaus geringere Wirkung aufweisen als Triamcinolon und Prednisolonacetat, haben wir die gleiche Konzentration zugesetzt, um uns eine möglichst objektive Vergleichsmöglichkeit des pharmakodynamischen Effekts zu schaffen.
Wir verwandten Corticosteron bzw. Hydrocortison, also Steroide, die am Anfang der Corticosteroidtherapie standen, und weder im, noch am Sterangerüst einen chemischen Substituenten aufweisen, um zu sehen, ob sie einen ähnlichen Effekt wie die oben genannten Hormone bewirken.

## M E T H O D E und A R B E I T S G A N G :

Das für die Versuche benötigte Knochenmark wird mittels Sternalpunktion von 5 Patienten gewonnen.
Ein Teil des Marks wird sofort am Krankenbett auf einem Objektträger ausgestrichen, später fixiert und nach PAPPENHEIM gefärbt. Das so erlangte Bezugspräparat ermöglicht, Veränderungen zu beurteilen, die bei der Knochenmarkkultivierung entstehen. Mit dem restlichen Material werden Knochenmarkkulturen nach der von BOLL [7] modifizierten CARELL'schen Methode angelegt. Es wird unter sterilen Bedingungen in einer durch UV-Strahlung keimarm gehaltenen Impfkapelle gearbeitet. Als Kulturmedium dient ein Koagulum, das sich zu 50 % aus durch Sedimentation in silikonisierten Röhrchen gewonnenen autologem Plasma, 30 % autologem Serum, 10% Corhormon$^{R}$, dreifach verstärkt und 10 % Corticosteron bzw. Hydrocortisonlösung ( 2,5 µg/ml) zusammensetzt.
Die im Koagulum dieser Zusatzkulturen erreichte Corticosteroidkonzentration beträgt demnach 0,25 µg/ml des jeweils verwandten Stoffes.
Auf dieses Medium wird ein Markbröckchen gelegt und mit einem Tropfen Serum, dem die gleiche Corticoidkonzentration beigefügt ist, bedeckt.
Anschließend wird darüber ein Hohlschliffobjektträger mit Vaseline befestigt, die fertige Kultur umgedreht, die Deckglasränder mit verflüssigtem Hartparaffin luftdicht verschlossen und als hängender Tropfen bei 37° C bebrütet.
Bei gleichem Arbeitsgang werden Kontrollkulturen ohne Hormonzusätze mit 40 % Serum angelegt.
Nach 24, 48 und 72 Stunden werden von jeder Kultur drei Ausstriche angefertigt, die gleich den Originalen nach PAPPENHEIM gefärbt werden.
Die Auswertung erfolgt grundsätzlich am qualitativ besten Präparat der jeweiligen Kulturzeit. Pro Stichprobe werden

nach Möglichkeit 2000 Zellen in mäanderförmiger Weise differenziert.
Folgende Zellen werden erfaßt und nach den von BOLL genannten Kriterien unterschieden:

A) Die Erythropoese differenziert in:

Proerythroblast ( PE )
basophiler Erythroblast ( bE )
polychromatischer Erythroblast ( pE )
oxyphiler Erythroblast ( oE )
reifer Erythroblast ( rE )

B) Die Granulopoese differenziert in:

Myeloblast (MB)
Promyelozyt (PM)
neutrophiler Myelozyt (MC)
eosinophiler Myelozyt (eMC)
basophiler Myelozyt (bMC)
Promonozyt (PMo)
Metamyelozyt (MM)
stabkerniger Granulozyt (Stab)
segmentkerniger Granulozyt (Seg)
eosinophiler segmentkerniger Granulozyt (e Seg)
basophiler segmentkerniger Granulozyt (b Seg)
Monozyt (Mo)

C) Die übrigen Zellen werden differenziert in:

Lymphoblast
Lymphozyt
kleine Retikulumzelle
große Retikulumzelle
phagozytierende Retikulumzelle
Plasmazelle
Megakaryoblast
Megakaryozyt

Von diesen differenzierten Zellen werden folgende nach ROHR [39] als teilungsfähig angesehen:
In der Erythropoese alle Zellen mit Ausnahme der reifen Erythroblasten.
In der Granulopoese der Myeloblast, Promyelozyt, Myelozyt, Metamyelozyt und Promonozyt.
In den übrigen Zellklassen Lymphoblasten und Megakaryoblasten.
Neben der Differenzierung der Zellarten benötigen wir auch die Abgrenzung der einzelnen Mitosephasen. Nach BOLL [6] unterscheiden wir sechs Teilungsstadien:

1) Prophase (P)
   Die Kernmembran ist aufgelöst, Nukleolen sind nicht mehr sichtbar, die Kernsubstanz ist aufgelockert bei noch festem Spirem.

2) Frühe Metaphase (fM)
   Die Chromosomen sind gut erkennbar und liegen im lockeren Spirem über die ganze Zelle verteilt.

3) Späte Metaphase (sM)
   In der Aufsicht ordnen sich die Chromosomen als Monaster seitlich zur Äquatorialplatte an.

4) Anaphase (A)
   Die Chromosomen sind in zwei Gruppen zu den Zellpolen hin geordnet. Sie zeigen das Bild eines Diasters.

5) Telophase (T)
   Die Zelle beginnt sich einzuschnüren, die Chromosomen bilden ein lockeres Dispirem.

6) Rekonstruktionsphase (R)
   Zwei Tochterzellen, die noch mit einem Zytoplasmafaden verbunden sein können, sind entwickelt. Die Chromosomen der Zellkerne zeigen ein festes Dispirem, eine Kernmembran ist noch nicht sichtbar.

Aus den ermittelten Zellzahlen werden, für die rote und weiße Reihe getrennt, Reifungskurven erstellt, die zeitabhängig die prozentuale Verteilung der einzelnen Zellreifungsstufen graphisch wiedergeben. Zusammen mit den G/E-Indices, den Mitose-Indices und den karyologischen Kurven dienen sie als Maß für die Auswirkung des Corticosterons bzw. Hydrocortisons auf die Proliferation der Hämatopoese.
Die G/E-Indices zeigen das relative Verhalten zwischen Erythropoese und Granulopoese zur entsprechenden Zeit.

Die Mitoseindices werden in Promille angegeben und errechnen sich aus der Anzahl der Mitosen auf 1000 teilungsfähige Zellen der roten bzw. der weißen Reihe.
Die karyologischen Kurven geben die prozentuale Verteilung der Mitosen graphisch wieder.
Weiterhin werden aus den ermittelten Differentialverteilungen für die fünf, den Versuchen zugrunde liegenden Fällen Mittelwertskurven erstellt. Diese graphischen Darstellungen sollen den Überblick über die Gesamtwirkung des Corticosterons bzw. des Hydrocortisons erleichtern.

Schließlich wird mit Hilfe des $x^2$-Tests nach H. PEARSON für die Versuche 1 - 5 eine Signifikanzberechnung angestellt.
Die Ergebnisse für die Mitoseindices, die retikulären und lymphatischen Zellen werden ebenfalls nach diesem Verfahren mathematisch abgesichert.

## E R G E B N I S S E :

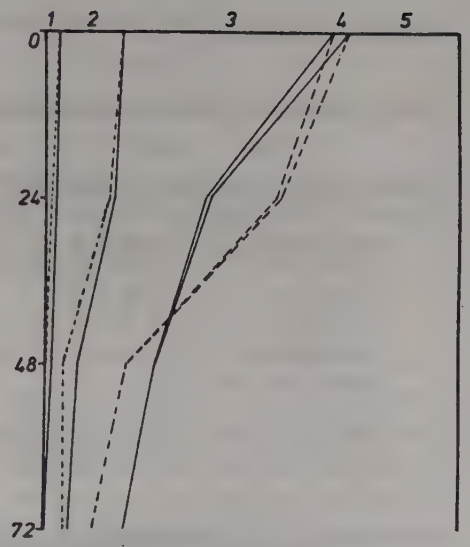
Für diese Untersuchungen wurden, wie bereits erwähnt, Knochenmarkproben von 5 Patienten als Material gewonnen.
Keiner der Spender war zur Zeit der Punktion einer Corticosteroid-Therapie ausgesetzt. Es wurden 52 Ausstrichpräparate ausgewertet, wobei 83836 Zellen einschließlich 652 Mitosen differenziert wurden.
Die folgenden Reifungskurven erhalten wir durch additives Auftragen der Prozentzahlen der Zellen unterschiedlicher Reifungsgrade auf der Abszisse.

Auf der Ordinate des Diagramms erfolgt die Angabe der Kultivierungszeit in Stunden.

Abb 1 ( Reifungskurven, ST F)

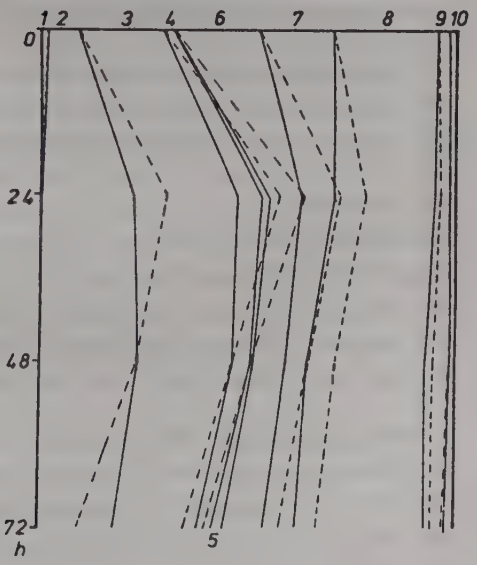
Kontrolle : ——————

Corticosteron : - - - - - - - -




## ERYTHROPOESE

1 = PE
2 = bE
3 = pE
4 = oE
5 = rE




## GRANULOPOESE

1 = MB
2 = PM
3 = MC
4 = eMC
5 = PMo
6 = MM
7 = Stab
8 = Seg
9 = eSeg
10 = Mo

Versuch 1: mit dem Knochenmark des Patienten St.F., 65 Jahre
und 0,25 µg/ml Corticosteron als Zusatz

Klinische Diagnose: Seit 1967 bekanntes Gamma-Plasmozytom.

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion: 100 mg Endoxan R/die

Blutbild am Tage der Sternalpunktion:

| | | |
|---|---|---|
| Hämoglobin | = | 11,3 g % |
| Erythrozyten | = | 3,66 Mill/ µl |
| Leukozyten | = | 1400 / µl |
| Eosinophile | = | 5 % |
| Basophile | = | 1 % |
| Stabkernige | = | 6 % |
| Segmentkernige | = | 41 % |
| Monozyten | = | 7 % |
| Lymphozyten | = | 40 % |
| Thrombozyten | = | 150.000/ µl |

A) Reifung der erythropoetischen und granulopoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen.

Wie aus der Reifungskurve (Abb.1) ersichtlich, nehmen in der Erythropoese mit zunehmender Kultivierungszeit die teilungsfähigen Erythroblasten ab. Diese Linksverschiebung der Kurven und die damit verbundene Zunahme der reifen Erythroblasten sind aus der Literatur [9] bekannt. Unter Einfluß des Corticosteron wird diese Tendenz bei den basophilen Erythroblasten verstärkt. Für die Zellformen der polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten wird die Linksverschiebung erst nach 48 Stunden sichtbar. Die Reifung bleibt hier sogar nach 24 Stunden zurück.

In der Granulopoese (Abb.1) erkennen wir bis zu 24 Stunden die typische Rechtsverschiebung der Kurven [10] , was eine relative Zunahme der teilungsfähigen Zellen bedeutet. Bei fortdauernder Kultivierung läßt diese Tendenz nach und

geht bei 48 Stunden in eine Linksverschiebung über, die nach 72-stündiger Kultivierung noch anhält. Durch Corticosteronzusatz wird die jeweilige Kurvenverschiebung verstärkt, wobei der Wendepunkt etwa bei 24 Stunden liegt.

B) G/E Indices (Tab. 1a, Seite 40)

Der G/E Index steigt sowohl bei den Kontrollen wie auch bei den Zusatzkulturen bis 72 Stunden stark an.
Nach 24 und 48 Stunden liegen die Werte der Kulturen mit Corticosteronzusatz unter denen der Kontrollen; lediglich nach 72 Stunden ist der Index geringfügig erhöht.

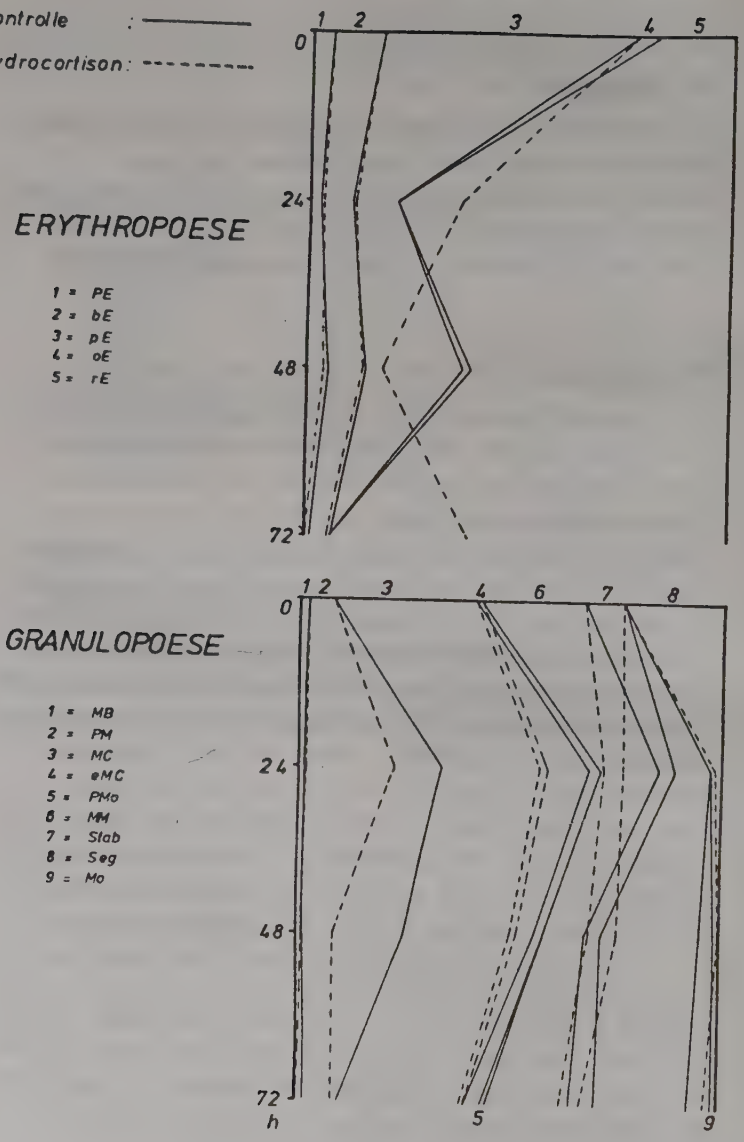
C) Regeneration (Tab. 2a + 2c, Seite 42 + 43)

Die roten Mitoseindices der Zusatzpräparate liegen deutlich unter den Kontrollwerten. Der Corticosteronzusatz hemmt folglich die Regeneration der Erythropoese, was durch ein gänzliches Fehlen von Mitosen nach 72 Stunden noch verdeutlicht wird. Die Mitoseindices für die Granulopoese zeigen bei den Kontrollpräparaten eine ansteigende Tendenz bis zu 48 Stunden, um erst am letzten Kulturtag wieder abzufallen. Die Werte der Zusatzkulturen liegen unter denen der Vergleichskulturen, so daß man auch in der Granulopoese von einer Regenerationshemmung sprechen kann.

Abb 2 (Reifungskurven, SK.)

Kontrolle : ——————

Hydrocortison: - - - - - - - -



Versuch 2: mit dem Knochenmark des Patienten S.K., 59 Jahre und 0,25 µg/ml Hydrocortison als Zusatz

Klinische Diagnose: Hepatosplenomegalie, chronische Pyelonephritis, chronische Bronchitis, Hypertonie.

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:

10 mg Valium R /die, Lanicor R 2 x 0,25 mg/die, Lasix R 40 mg/die, Bactrim R 1 x 1 Tabl./die.

Blutbild am Tage der Sternalpunktion:

Hb = 15,4 g %
Erythrozyten = 6,20 Mill/ µl
Hb = 24,8 pg
Leukozyten = 7100 / µl
Thrombozyten = 165000/ µl

A) Reifung der erythropoetischen und granulopoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen (Abb. 2)

Wie wir schon bei Versuch 1 mit Corticosteron sahen, wird auch bei Hydrocortison in der Erythropoese dieses Versuchs die Ausreifung der polychromatischen Erythroblasten am stärksten beeinflußt. Vergleichbar sind die auch hier beobachtete relative Rechtsverschiebung der Zusatzkurve nach 24 Stunden und eine ausgeprägte Linksverschiebung bei 48 Stunden. Nach 72-stündiger Kultivierung hingegen sind die Kontrollen besser ausgereift.
In der Granulopoese findet sich in den Kontrollen eine starke Rechtsverschiebung nach 24 Stunden; bei länger andauernder Bebrütungszeit eine Tendenz zur Abnahme der teilungsfähigen Zellen. Unter Hydrocortisonzusatz nehmen die teilungsfähigen Zellformen der Granulopoese schon nach 24 Stunden ab. Diese Linksverschiebung bleibt auch an den

beiden folgenden Versuchstagen bestehen.

B) G/E -Indices (Tab. 1b)

Die G/E-Indices der Zusatzpräparate liegen bei 24 und 48 Stunden unter den Kontrollindices, nach 72 Stunden geringfügig darüber.

C) Regeneration (Tab. 2b + 2d)

Der rote Mitoseindex steigt bei den Kontrollen bei 24 Stunden an, nimmt dann bis 72 Stunden ab. Nach Hydrocortisonzusatz ist schon der 24-Stunden-Wert deutlich erniedrigt, bei 48 und 72 Stunden ist er gleich null.
Die in Versuch 1 durch Corticosteron erzielte Hemmung der Regeneration der Erythropoese wird hier durch Hydrocortisonzusatz sogar noch übertroffen.
Der weiße Mitoseindex steigt in vitro stark an, fällt dann aber zum dritten Kulturtag wieder ab. Die Indices nach Zusatz liegen bei 24 und 48 Stunden unter denen der Kontrollen; bei 72 Stunden wird dieser Kontrollwert jedoch wieder überschritten.

Abb. 3 (Reifungskurven, EE)

Kontrolle ——————

Corticosteron: - - - - - - - -

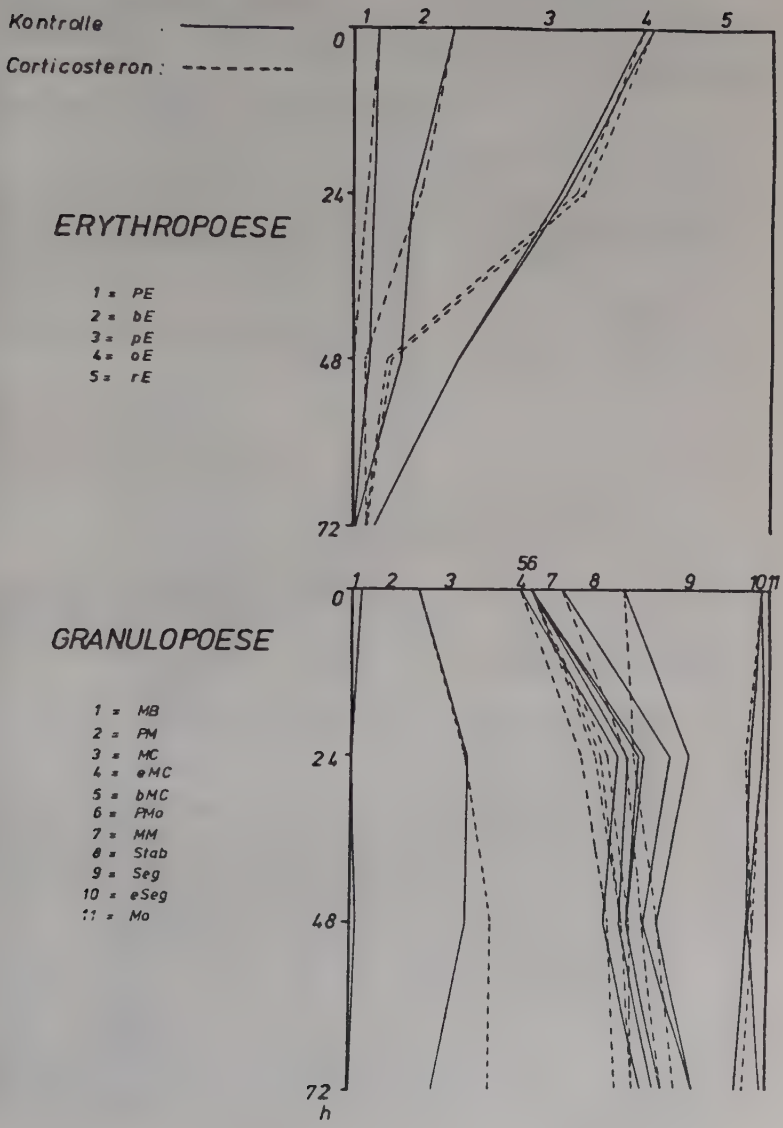
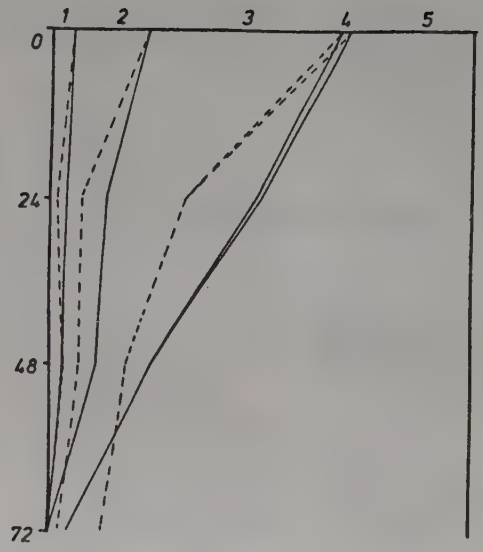


Abb. 4 (Reifungskurven, EE.)

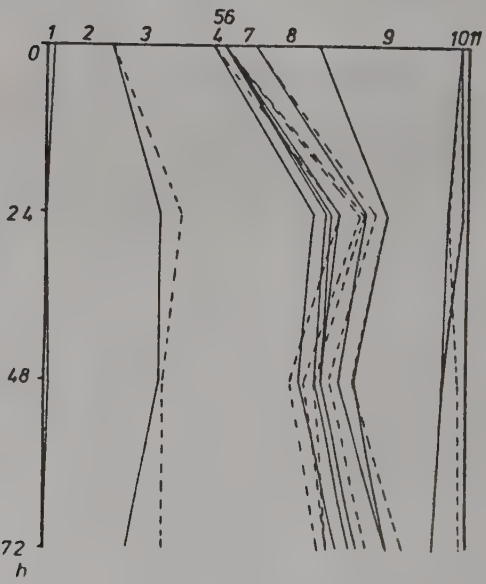
Kontrolle : ——————

Hydrocortison : - - - - - - -




ERYTHROPOESE

1 = PE
2 = bE
3 = pE
4 = oE
5 = rE




GRANULOPOESE

1 = MB
2 = PM
3 = MC
4 = eMC
5 = bMC
6 = PMo
7 = MM
8 = Stab
9 = Seg
10 = eSeg
11 = Mo

Versuch 3 mit dem Knochenmark des Patienten E.E., 61 Jahre und 0,25 µg/ml Corticosteron, bzw. 0,25 µg/ml Hydrocortison als Zusatz.

Klinische Diagnose: Hyperchrome Anämie bei intestinaler Blutung und Apoplexie mit Hemiparese.

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:

Euglucon R 1 Tabl./die, Reparil R 3x2 Drag./die, Ferrlecit R 3x30 Tropf./die, Lanicor R 2x1 Tabl./die, Phosphalogel R 3x1 Löff./die.

Blutbild am Tage der Sternalpunktion:

Hb = 12,0 g %
Erythrozyten = 3,10 Mill/µl
$Hb_E$ = 38,6 pg
Thrombozyten = 116 000 / µl
Eosinophile = 6 %
Segmentkernige = 70 %
Lymphozyten = 18 %
Monozyten = 6 %
Blutzucker = 87 mg %

A) Reifung der erythropoetischen und granulopoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen. (Abb. 3+4)

In der Erythropoese dieses Versuches sehen wir analog zu Versuch 1 eine fast gleichmäßige Abnahme der unreifen Erythroblasten während der drei Kulturtage.
Unter Corticosteroneinfluß ist nach 24-stündiger Kultivierung eine geringe Rechtsverschiebung der Kurven zu beobachten, die während der zwei folgenden Kulturtage in eine Linksverschiebung, im Sinne einer signifikant nachgewiesenen Reifungsförderung, übergeht.
Ein mit dem Knochenmark desselben Spenders kultivierter Hydrocortisonzusatz hingegen bewirkt schon nach 24 Stunden

eine signifikante Linksverschiebung der erythropoetischen Kurven. Diese beschleunigte Ausreifung in den Zusatzkulturen läßt während des folgenden Versuchstages nach und geht nach 72 Stunden in eine geringe Rechtsverschiebung über.

In der Granulopoese finden wir, wie schon bei den beiden vorangegangenen Versuchen eine Rechtsverschiebung nach 24 Stunden. Die folgende Abnahme der teilungsfähigen Zellen hält jedoch nur bis 48 Stunden an. Am letzten Kulturtag beobachten wir wieder eine geringe Rechtsverschiebung der Kurven.

Während Corticosteron nach 24-stündiger Kultivierung eine Linksverschiebung gegenüber den Kontrollkulturen bewirkt, zeigt sich unter Hydrocortisoneinfluß zur selben Kulturzeit eine entgegengesetzte Tendenz. Ab 48 Stunden sind beide Zusatzkulturen nur wenig beeinflußt.

B) G/E-Indices (Tab. 1a/b)

Wie schon bei Versuch 1 steigen die G/E-Indices an, was auf eine relative Verminderung der Erythropoese zurückzuführen ist.

Mit Ausnahme des 24-Stunden-Wertes unter Hydrocortisoneinfluß liegen alle Indices beider Zusätze unter ihren jeweiligen Kontrollwerten.

C) Regeneration (Tab. 2a - d)

Der rote Mitoseindex nimmt in der Kontrolle bis 24 Stunden ab, bleibt dann bis 48 Stunden etwa konstant und ist nach 72 Stunden gleich null.

Bei beiden Zusätzen liegen die Indices über den Kontrollen, wobei unter Hydrocortisonzusatz die Mitosezunahme ausgeprägter erscheint. Nach 72 Stunden konnten keine Mitosen mehr differenziert werden.

Die weißten Mitoseindices steigen sowohl bei Corticosteron als auch bei Hydrocortisonzusatz bis zum Ende des zweiten Versuchstages an, um während des dritten Kulturtages wieder

abzufallen. Die Kontrollwerte liegen deutlich unter denen der Zusätze und bleiben während der gesamten Versuchsdauer etwa auf gleicher Höhe.

Abb 5 (Reifungskurven, PE.)

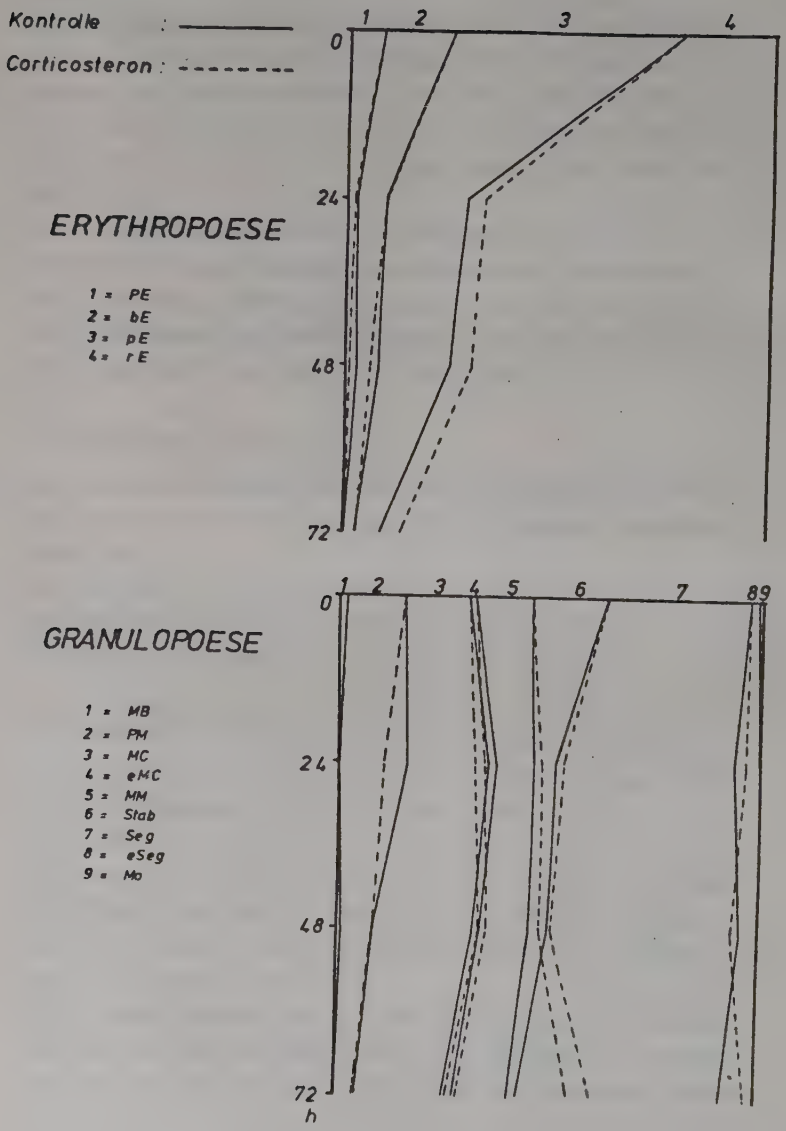
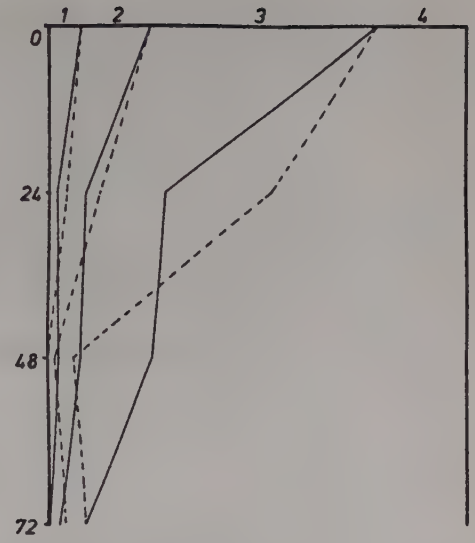


Abb. 6 (Reifungskurven, P.E.)

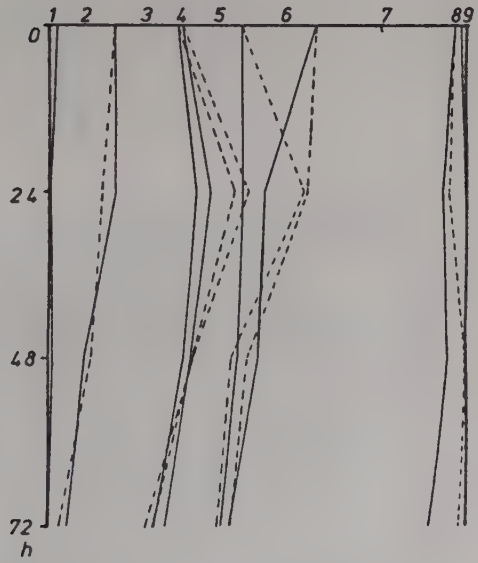
Kontrolle : ——————

Hydrocortison : ----------




ERYTHROPOESE

1 = PE
2 = bE
3 = pE
4 = rE




GRANULOPOESE

1 = MB
2 = PM
3 = MC
4 = eMC
5 = MM
6 = Stab
7 = Seg
8 = eSeg
9 = Mo

Versuch 4: mit dem Knochenmark des Patienten P.E., 78 Jahre
0,25 µg/ ml Corticosteron bzw. 0,25 µg/ml Hydrocortison als Zusatz

Klinische Diagnose: Dekompensiertes Mitralvitium, Herdpneumonie rechts, Harnwegsinfekt, Ca solidum d. li Mamma.

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:

Bisolvon R 3x40 i.v./die, Lanicor R 2x1 Tabl./die, Ledermycin R 2x300 mg/die, Aldactone R 2x2 Drag./die, Lasix R 1 Tabl./die.

Blutbild am Tage der Sternalpunktion:

Hb = 12,8 g %
Erythrozyten = 4,15 Mill / µl
$Hb_E$ = 30,8 pg
Leukozyten = 11 300 / µl
Harnstoff = 8,2 mg %
Kalium = 5,5 mval/l
Kalzium = 4,5 mval/l
Natrium = 135 mval/l
Kreatinin = 1,2 mg %

A) Reifung der erythropoetischen und granulopoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen (Abb. 5+6)

Betrachtet man die Erythropoese dieses Versuches, so werden die unreifen Zellformen durch Corticosteronzusatz kaum beeinflußt. Wie schon in den vorangegangenen Versuchen wird die stärkste Abweichung gegenüber den Kontrollen für die Kurve der polychromatischen Erythroblasten erzielt. Während der drei Versuchstage wird ihre Ausreifung etwa gleichmäßig wenig gehemmt, was durch eine Rechtsverschiebung der Kurve angezeigt wird.
Hydrocortison bewirkt nach 24 Stunden eine Reifungshemmung

aller Zellformen. Diese Rechtsverschiebung der Reifungskurve geht jedoch während des folgenden Kulturtages in eine Linksverschiebung über. Nach 72 Stunden ist die Kultur wieder unbeeinflußt.
In der Granulopoese finden wir nach 24 Stunden einen ungewöhnlich hohen Anteil reifer Granulozyten. Die Vermehrung der teilungsfähigen Zellen ist nach 24 Stunden sehr gering, sie nehmen am 2. und 3. Kulturtag auch nur wenig ab. Für beide Zusätze zeigen die Reifungskurven ein uneinheitliches Bild. Während bei 24 Stunden unter Corticosteroneinwirkung die Kurven der unreifen Zellen vorwiegend linksverschoben erscheinen, bewirkt Hydrocortison nach 24 Stunden eine Rechtsverschiebung wie schon im 3. Versuch. Nach 48 und nach 72 Stunden sind die Reifungskurven durch die Zusätze kaum noch beeinflußt, lediglich die stabkernigen und segmentkernigen Granulozyten sind mit Corticosteron nach 72 Stunden relativ vermindert.

B) G/E-Indices: (Tab. 1a/b)

Unter Corticosteroneinfluß liegt der G/E-Index nach 24 Stunden wenig über dem Kontrollwert. Während der folgenden 24 Stunden fällt er ab und bleibt auch am letzten Kulturtag unter dem entsprechenden Kontrollindex.
Bei Hydrocortisonzusatz zeigt sich zu allen Zeiten entgegengesetzte Tendenz.

C) Regeneration: (Tab. 2a - d)

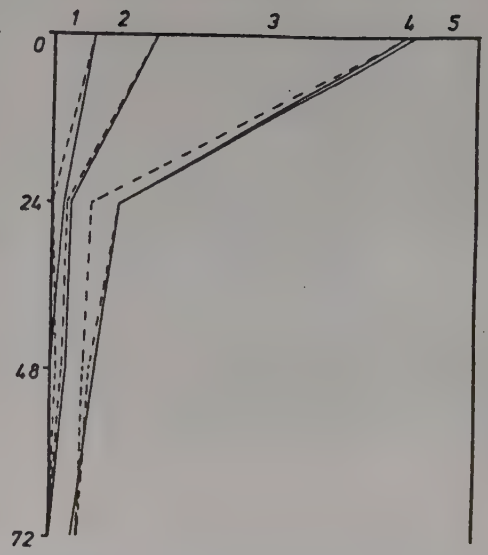
Der rote Mitoseindex ist im Vergleich zu den Kontroll-Indices der vorangegangenen Versuche nach 24 Stunden deutlich erniedrigt. Der 48-Stunden-Index fällt dagegen als ungewöhnlich hoher Wert heraus.
Daher liegt bei Hydrocortisonzusatz der 24-Stunden-Index zwar knapp über der Kontrolle, ein Ausbleiben der Mitosen während der beiden folgenden Kulturtage aber macht eine deutlich regenerationshemmende Wirkung des Zusatzes sichtbar. Unter Corticosteroneinfluß sind alle vergleichbaren Indices erniedrigt.

Auch die weißen Mitoseindices des Versuches werden durch Corticosteron deutlich erniedrigt. Bei Hydrocortisonzusatz sind die Werte nach 24 und 48 Stunden Kultivierung erhöht, der 72-Stunden-Index liegt leicht unter dem Kontrollwert.

Abb. 7 (Reifungskurven, MTH.)

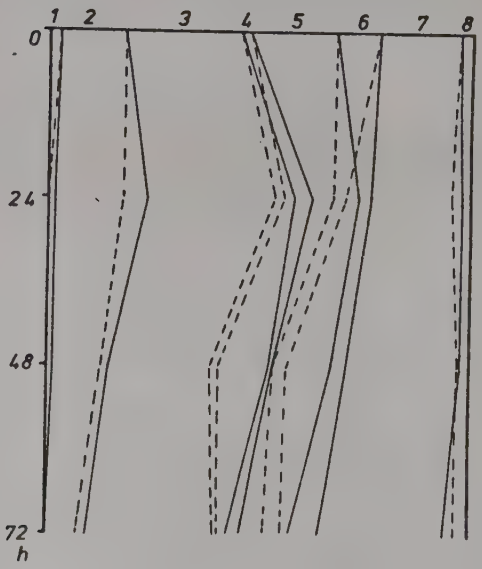
Kontrolle : ——————

Corticosteron : - - - - - - - -




ERYTHROPOESE

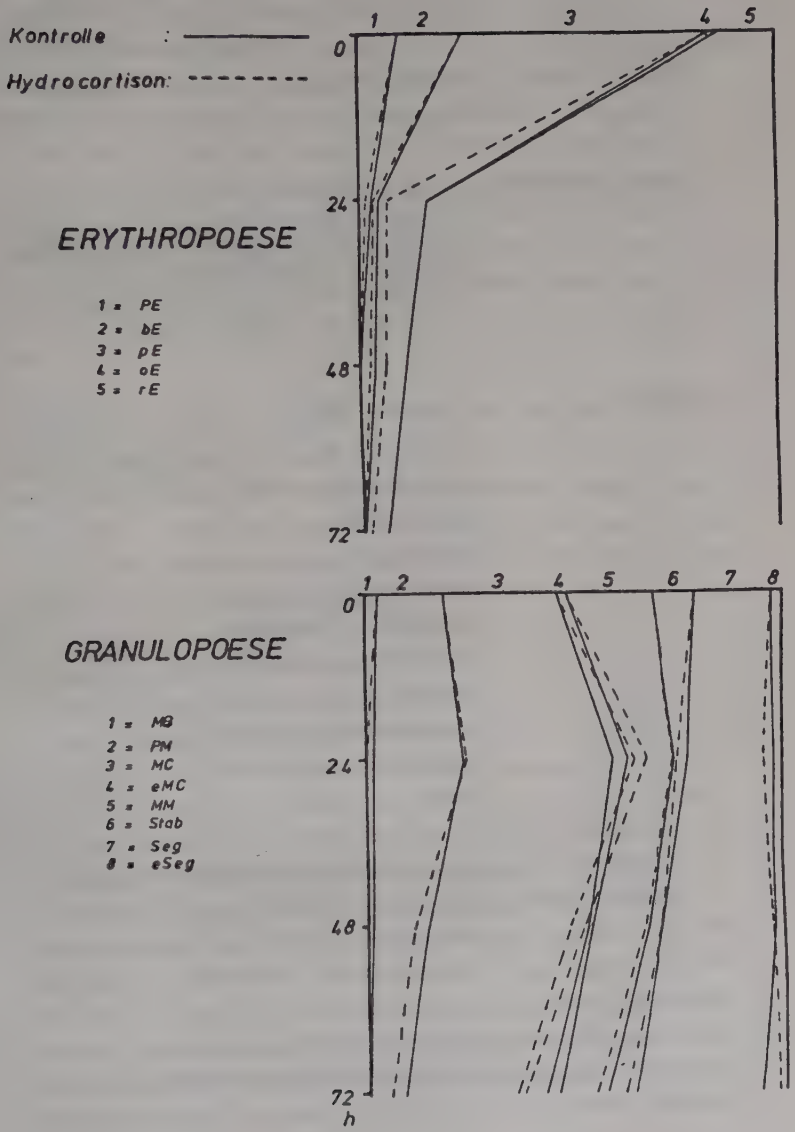
1 = PE
2 = bE
3 = pE
4 = oE
5 = rE




GRANULOPOESE

1 = MB
2 = PM
3 = MC
4 = eMC
5 = MM
6 = Stab
7 = Seg
8 = eSeg

Abb. 8 (Reifungskurven, M.T.H.)



Versuch 5: mit dem Knochenmark der Patientin M.Th., 72 Jahre.
0,25 µg/ml Corticosteron bzw. 0,25 µg/ml Hydrocortison als Zusatz

Klinische Diagnose: Panzytopenie bei Hepatosplenomegalie, latenter Diabetes mell., chron. Pyelonephritis.

Therapie zur Zeit der Sternalpunktion:

Lanitop R 1/2 - 1 Tabl./die,
Aldactone R 2x80 mg/die, Lasix R 1 Tabl. /die,
Valium R 10 mg/die.

Blutbild am Tage der Sternalpunktion:

Hb = 9,6 g %
Erythrozyten = 3,54 Mill/µl
Hb = 27,0 pg
Thrombozyten = 50 000 µl
Quick = 86 %
Leukozyten = 2250 µl
Eosinophile = 1 %
Stabkernige = 2 %
Segmentkernige = 62 %
Lymphozyten = 29 %
Monozyten = 6 %

A) Reifung der erythropoetischen und granulopoetischen Knochenmarkzellen in den Kulturen.

Wie wir aus den Reifungskurven für die Erythropoese ersehen, nehmen die teilungsfähigen Erythroblasten bei den Kontrollkulturen stark ab.
In diesem Versuch wird dieser Effekt sowohl durch Corticosteron als auch durch Hydrocortison verstärkt, wobei nach 24 Stunden die Linksverschiebung der Kurven am stärk-

sten ist.

In der Granulopoese dieses Versuchs finden wir in den Kontrollen nach 24 Stunden, wie in den vorangegangenen Versuchen eine Rechtsverschiebung der Kurven, an den beiden folgenden Kulturtagen eine Abnahme der teilungsfähigen Zellen.

Bei den Kulturen mit Corticosteronzusatz finden wir über alle drei Versuchstage eine Linksverschiebung, die bei 48 Stunden am stärksten ausgeprägt ist. Unter Hydrocortisoneinfluß wird die Rechtsverschiebung der Kontrollkulturen bei 24 Stunden verstärkt. Am folgenden Kulturtag geht die Kurve in eine Linksverschiebung über, so daß auch in diesem Versuch am Ende des dritten Kulturtages noch eine reifungsfördernde Wirkung des Zusatzes zu erkennen ist.

B) G/E-Indices: (Tab. 1a/b)

Der G/E-Index der Kontrollen steigt bis 48 Stunden an, um während der letzten 24 Stunden des Versuches wieder leicht abzufallen. In den Zusatzkulturen sehen wir die gleiche Tendenz wie bei den Kontrollen, wobei unter Hydrocortison der Einfluß etwas ausgeprägter ist.

C) Regeneration (Tab. 2a - d)

Der rote Mitoseindex fällt während der ersten 24 Stunden. An den folgenden beiden Kulturtagen konnten wegen des geringen Anteils an Erythroblasten keine Mitosen mehr differenziert werden. Nur unter Corticosteroneinfluß konnte noch nach 24-stündiger Versuchsdauer ein bereits erniedrigter roter Mitoseindex ermittelt werden. Unter Hydrocortisonzusatz waren schon am ersten Kulturtag keine Mitosen mehr zu finden.

Die weißen Mitoseindices geben ein sehr uneinheitliches Bild. Bei beiden Zusätzen liegen die 48-Stunden-Werte deutlich über den Kontrollen. Im Hydrocortison-Präparat werden während des letzten Kulturtages keine Mitosen mehr differenziert.

Abb 9 (Mittelwerte der Reifungskurven aus 4 Versuchen)

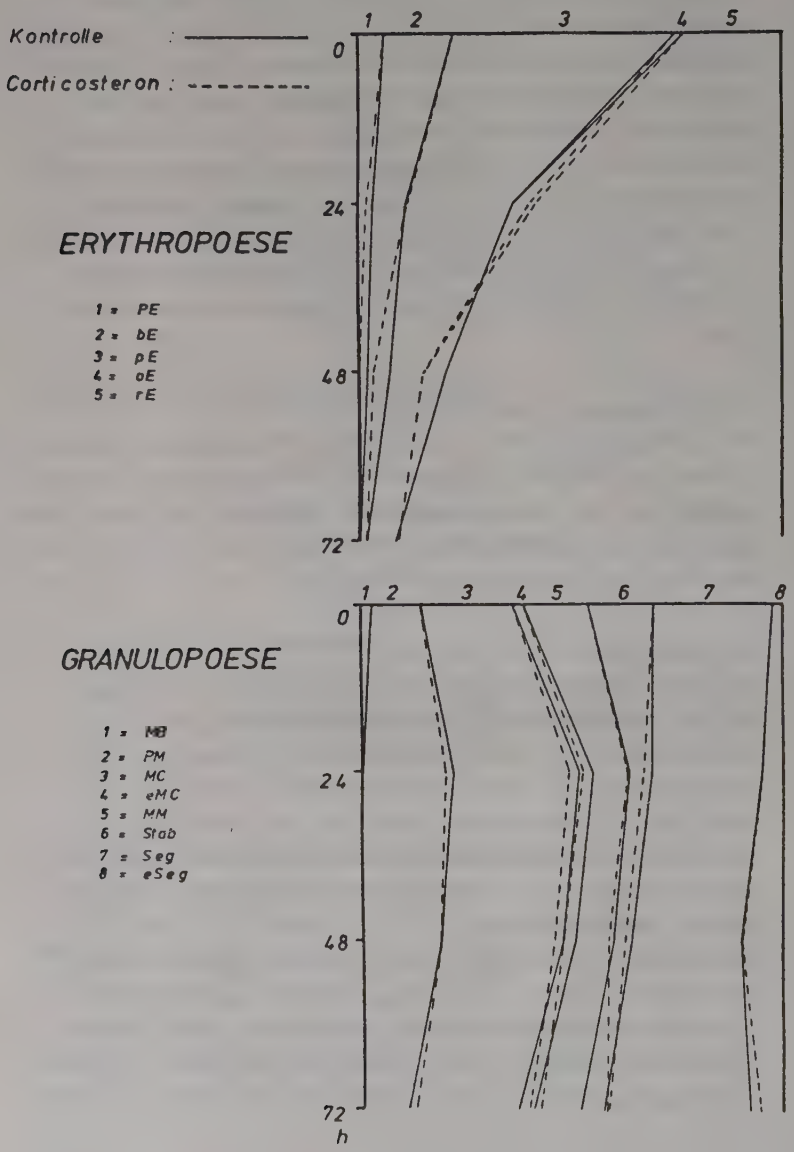


Abb.10 (Mittelwerte der Reifungskurven aus 4 Versuchen)

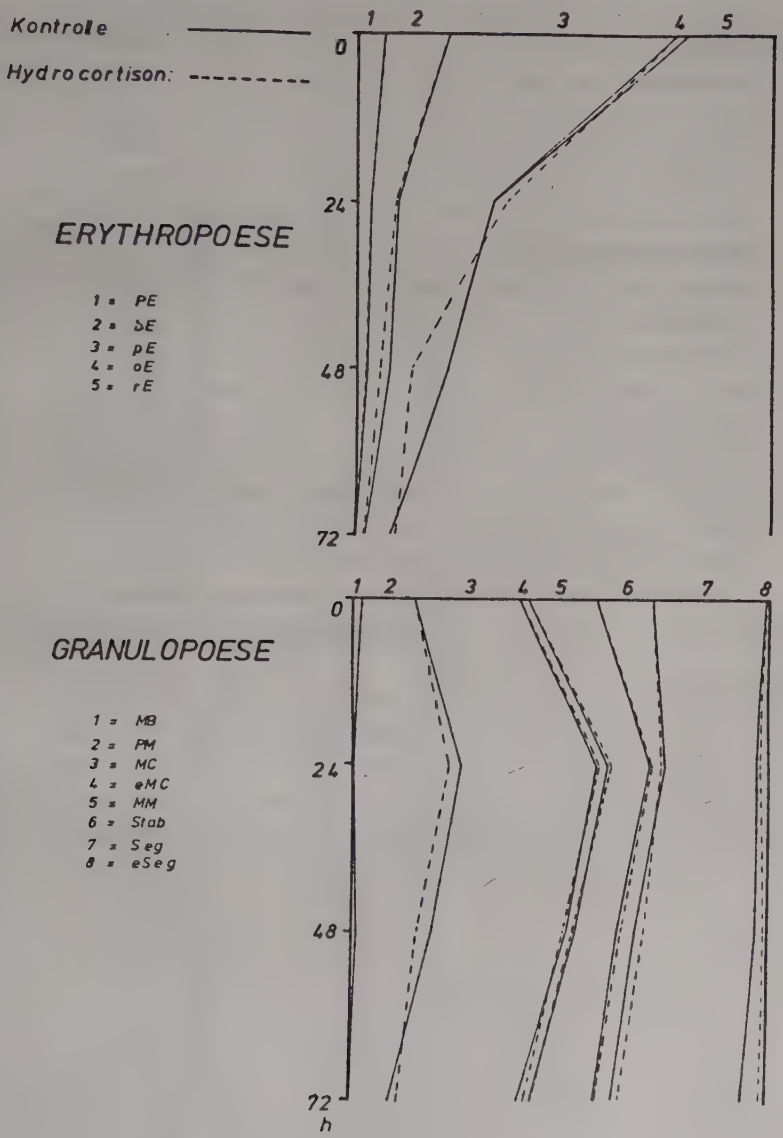
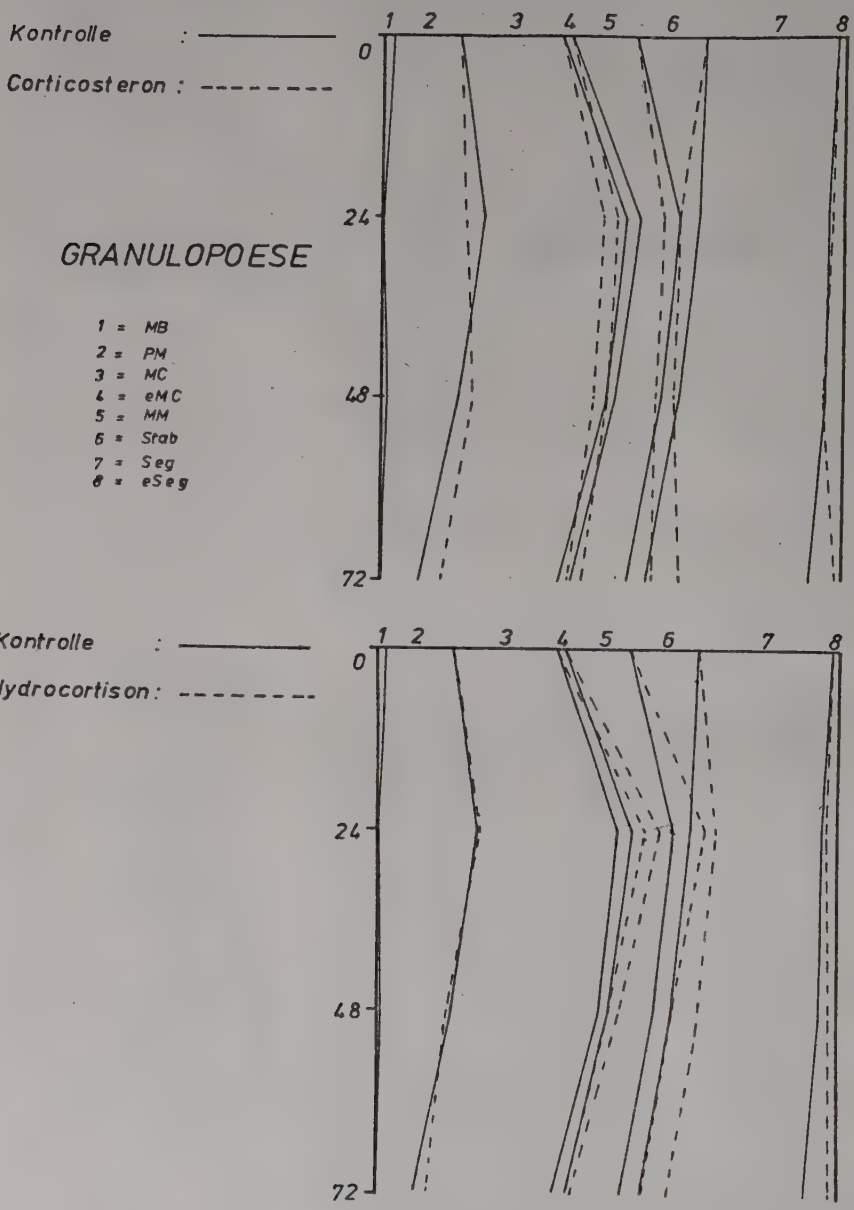


*Abb.10a (Mittelwerte der Reifungskurven aus 3 Versuchen)*



Mittelwerte der Reifungskurven aus jeweils vier Versuchen getrennt für Corticosteron und Hydrocortison errechnet: (Abb. 9 + 10)

Für die Erythropoese zeigt die gemittelte prozentuale Verteilung der Originalausstriche nur eine geringe Abweichung gegenüber den Normalwerten. Wie aus den graphischen Darstellungen ersichtlich, nehmen mit fortdauernder Kultivierungszeit die unreifen Zellformen zugunsten der reifen Erythroblasten entsprechend der Normalwerte von BOLL [9] ab. Beide Corticosteroidzusätze lassen lediglich bei 48 Stunden eine etwas stärkere Abweichung der Zusatzkurven erkennen. Hierbei muß beachtet werden, daß diese Linksabweichung der gemittelten Zusatzkurven unter Corticosteroneinfluß fast ausschließlich durch den 48-Stunden-Zusatzwert in Versuch 3 hervorgerufen wird. Wie die Tabelle (s. Tab.5/8) beweist, fällt dieser, im Sinne einer Reifungsförderung hochsignifikante Wert, aus dem Gesamtbild der übrigen Versuche heraus. Die Abweichungen der gemittelten Hydrocortison-Zusatzkurven sind mit den gerade beschriebenen durchaus vergleichbar (s. Abb. 10), wenn sie auch nach 48 Stunden etwas ausgeprägter im Sinne einer Reifungsförderung zu werten sind.

Die Granulopoese zeigt nach 24 Stunden eine in allen Versuchen beobachtete Rechtsverschiebung der Kurven, die an den folgenden beiden Kulturtagen wieder abnimmt, entsprechend den Normalwerten von BOLL [10]. Die Mittelwertskurven nach Zusatz von Corticosteron weichen nur wenig nach links, die von Hydrocortison nur wenig nach rechts ab.

G/E - Indices

Tabelle 1a)

| Versuch | Kontrolle 0 h | Kontrolle 24 h | Kontrolle 48 h | Kontrolle 72 h | Corticosteron 24 h | Corticosteron 48 h | Corticosteron 72 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 1,93 | 5,74 | 15,15 | 17,78 | 4,16 | 10,10 | 19,74 |
| III | 2,32 | 2,36 | 7,90 | 9,63 | 1,84 | 4,31 | 6,72 |
| IV | 6,71 | 6,88 | 6,42 | 7,08 | 7,44 | 5,51 | 5,18 |
| V | 2,54 | 4,68 | 6,06 | 5,19 | 4,03 | 5,47 | 4,80 |
| Summe | 13,50 | 19,66 | 35,53 | 39,68 | 17,47 | 25,39 | 36,44 |
| Mittel-wert | 3,38 | 4,92 | 8,88 | 9,92 | 4,37 | 6,35 | 9,11 |

Tabelle 1b)

| Versuch | Kontrolle 0 h | Kontrolle 24 h | Kontrolle 48 h | Kontrolle 72 h | Hydrocortison 24 h | Hydrocortison 48 h | Hydrocortison 72 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| II | 3,59 | 9,57 | 16,27 | 13,32 | 7,01 | 8,10 | 13,51 |
| III | 2,32 | 2,36 | 7,90 | 9,63 | 4,29 | 6,25 | 6,06 |
| IV | 6,71 | 6,88 | 6,42 | 7,08 | 4,34 | 10,16 | 11,20 |
| V | 2,54 | 4,68 | 6,06 | 5,19 | 5,20 | 7,56 | 2,81 |
| Summe | 15,16 | 23,49 | 36,65 | 35,22 | 20,84 | 32,07 | 53,58 |
| Mittel-wert | 3,79 | 5,87 | 9,16 | 8,81 | 5,21 | 8,02 | 13,40 |

Zusammenfassung der G/E-Indices: (Tab. 1a + b)

Der mittlere G/E-Index steigt bei den Kontrollen beider Versuchsreihen von den Originalen bis zu 48 Stunden an, bleibt dann etwa gleich.
Mit Ausnahme des 72-Stunden-Wertes bei den Kulturen mit Hydrocortison-Zusatz liegen alle Zusatz-Indices unter ihren jeweiligen Kontrollwerten.

Zusammenfassung der Mitoseindices aus jeweils 4 Versuchen, getrennt für Corticosteron und Hydrocortison errechnet. (Tab. 2a - d)

A. Der mittlere rote Mitoseindex der Originalausstriche liegt bei 30 ‰. Während der ersten beiden Kulturtage hält er sich auf gleicher Höhe, um erst während der letzten 24 Stunden des Versuches abzufallen. Die Indices werden durch den Corticosteron-Zusatz zu allen Zeiten herabgesetzt. (Tab. 2a+5/17+18) Unter Hydrocortisoneinfluß sind die entsprechenden Werte gegenüber den Kontrollen gleichfalls erniedrigt.

B. Der mittlere weiße Mitoseindex zeigt für beide Versuchsreihen einen Anstieg von den Originalen zu den 24-Stunden-Kontrollkulturen. Am zweiten und am ausgeprägtesten am dritten Versuchstag fällt der Index wieder ab. Die Abweichung der Indices unter dem jeweiligen Hormonzusatz sind gegenüber den Kontrollen gering, so daß sie als zufällig (Tab. 5/19) angesehen werden müssen. (Tab. 2c + d)

Mitose-Indices in ‰

A) Erythropoese

Tabelle 2a)

| Versuch | Kontrolle 0 h | Kontrolle 24 h | Kontrolle 48 h | Kontrolle 72 h | Corticosteron 24 h | Corticosteron 48 h | Corticosteron 72 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 15,05 | 47,62 | 35,25 | 47,62 | 14,94 | 29,41 | 0 |
| III | 32,71 | 17,61 | 18,87 | 0 | 19,50 | 34,48 | 0 |
| IV | 35,53 | 14,29 | 62,50 | 0 | 13,33 | 23,80 | 0 |
| V | 40,51 | 37,02 | 0 | 0 | 27,03 | 0 | 0 |
| Summe | 123,80 | 116,54 | 113,62 | 47,62 | 74,80 | 87;69 | 0 |
| Mittel-wert | 30,95 | 29,14 | 28,41 | 11,91 | 18,70 | 21,92 | 0 |

Tabelle 2b)

| Versuch | Kontrolle 0 h | Kontrolle 24 h | Kontrolle 48 h | Kontrolle 72 h | Hydrocortison 24 h | Hydrocortison 48 h | Hydrocortison 72 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| II | 14,66 | 25,00 | 22,73 | 4,55 | 8,04 | 0 | 0 |
| III | 32,71 | 17,61 | 18,87 | 0 | 44,65 | 40,82 | 0 |
| IV | 35,53 | 14,29 | 62,50 | 0 | 15,54 | 0 | 0 |
| V | 40,51 | 37,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Summe | 123,41 | 93,92 | 104,10 | 4,55 | 68,23 | 40,82 | 0 |
| Mittel-wert | 30,85 | 23,48 | 26,03 | 1,14 | 17,06 | 10,21 | 0 |

Mitose-Indices in ‰

B) Granulopoese

Tabelle 2c)

| Versuch | Kontrolle 0 h | Kontrolle 24 h | Kontrolle 48 h | Kontrolle 72 h | Corticosteron 24 h | Corticosteron 48 h | Corticosteron 72 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 4,60 | 15,71 | 25,42 | 9,65 | 13,61 | 18,32 | 7,33 |
| III | 5,81 | 6,99 | 7,18 | 6,00 | 13,96 | 16,93 | 15,70 |
| IV | 2,61 | 8,83 | 5,37 | 6,13 | 1,22 | 2,69 | 0 |
| V | 5,30 | 11,29 | 2,86 | 6,63 | 8,75 | 8,84 | 6,90 |
| Summe | 18,32 | 42,82 | 40,83 | 28,41 | 37,54 | 46,78 | 29,93 |
| Mittel-wert | 4,58 | 10,71 | 10,21 | 7,10 | 9,39 | 11,70 | 7,48 |

Tabelle 2d)

| Versuch | Kontrolle 0 h | Kontrolle 24 h | Kontrolle 48 h | Kontrolle 72 h | Hydrocortison 24 h | Hydrocortison 48 h | Hydrocortison 72 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| II | 2,91 | 24,14 | 21,74 | 2,66 | 19,93 | 7,38 | 10,89 |
| III | 5,81 | 6,99 | 7,18 | 6,00 | 12,08 | 12,66 | 6,47 |
| IV | 2,61 | 8,83 | 5,37 | 6,13 | 11,63 | 8,13 | 5,36 |
| V | 5,30 | 11,29 | 2,86 | 6,63 | 11,52 | 19,75 | 0 |
| Summe | 16,63 | 51,25 | 37,15 | 21,42 | 55,16 | 47,92 | 22,72 |
| Mittel-wert | 4,16 | 12,81 | 9,29 | 5,36 | 13,79 | 11,98 | 5,68 |

Abb.11 (Karyologische Kurven der Erythropoese)

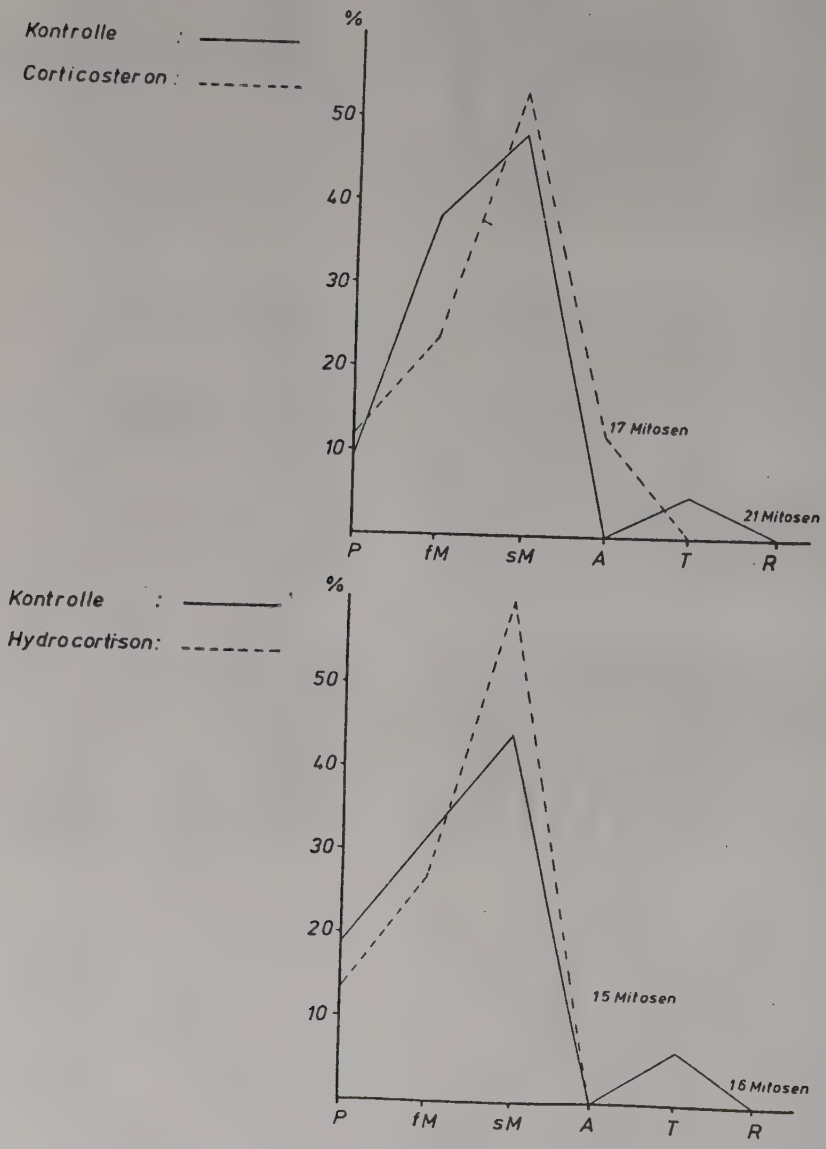
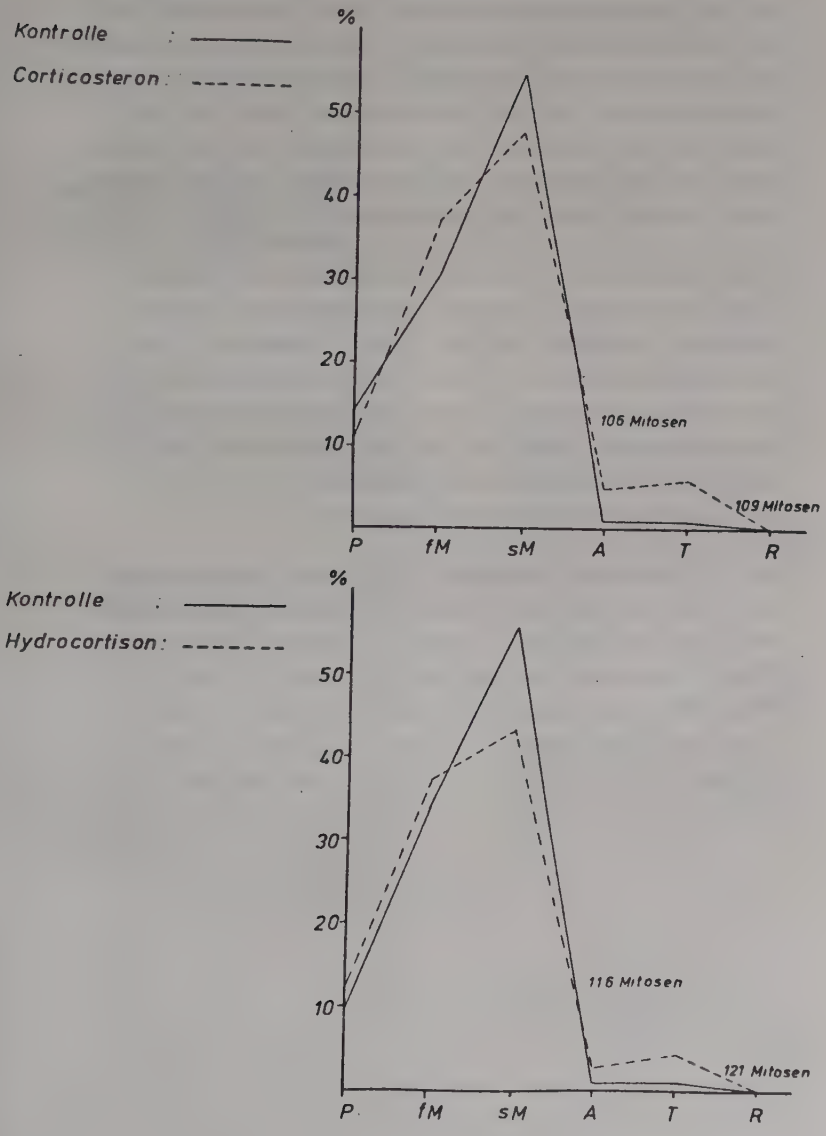


Abb 12 (Karyologische Kurven der Granulopoese)



Karyologische Kurven: (Abb. 11 + 12)

In den karyologischen Kurven wird die aus allen Versuchen prozentual ermittelte Mitosephasenverteilung graphisch dargestellt. Diese wird sowohl für die Erythropoese wie auch für die Granulopoese getrennt für Corticosteron und Hydrocortison aufgeführt. Wie aus den Abbildungen hervorgeht, steigen für die Granulopoese die Kontrollen der karyologischen Kurven von den Prophasen bis hin zu den späten Metaphasen an. Hier liegt der Gipfelpunkt der Kurven. Es folgt ein steiler Abfall zu den Anaphasen. Rekonstruktionsphasen konnten nicht mehr differenziert werden.

Die karyologischen Kurven für die Erythropoese zeigen einen auch aus der Literatur (BOLL) bekannten charakteristischen Gipfelpunkt für die späten Metaphasen. Wegen der geringen Anzahl von 38 bzw. 31 differenzierten roten Mitosen aus den Kontroll- und Zusatzpräparaten besitzen diese Darstellungen einen nur geringen Aussagewert. Sie wurden dennoch zum besseren Vergleich der Wirkungsweisen der verwandten Hormonzusätze aufgeführt.

Der Einfluß beider Hormonzusätze auf die karyologischen Kurven der weißen Reihe ist fast identisch. Wie bei den Kontrollen, erfolgt ein Anstieg der Kurven bis hin zu den späten Metaphasen, dem ein steiler Abfall zu den Anaphasen folgt. Schon der optische Vergleich zwischen unseren Kontroll- und Zusatzkurven läßt die Wirkung der verwandten Corticosteroide auf den Ablauf der Mitose als zufällig erscheinen.

Abb. 13 (Mittelwerte der Retikulumzellen)

GR = Große Retikulumzelle

KR = Kleine Retikulumzelle

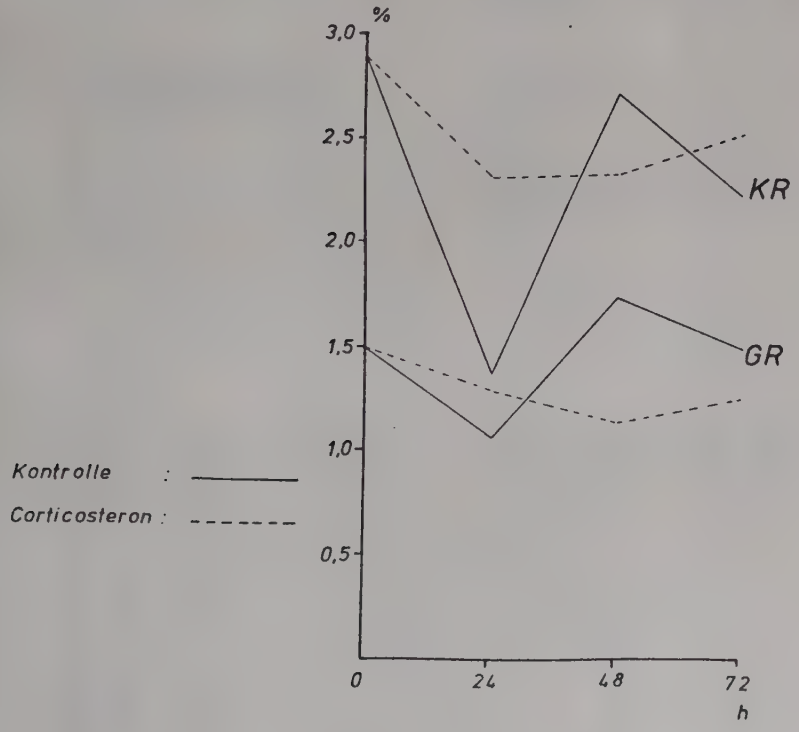
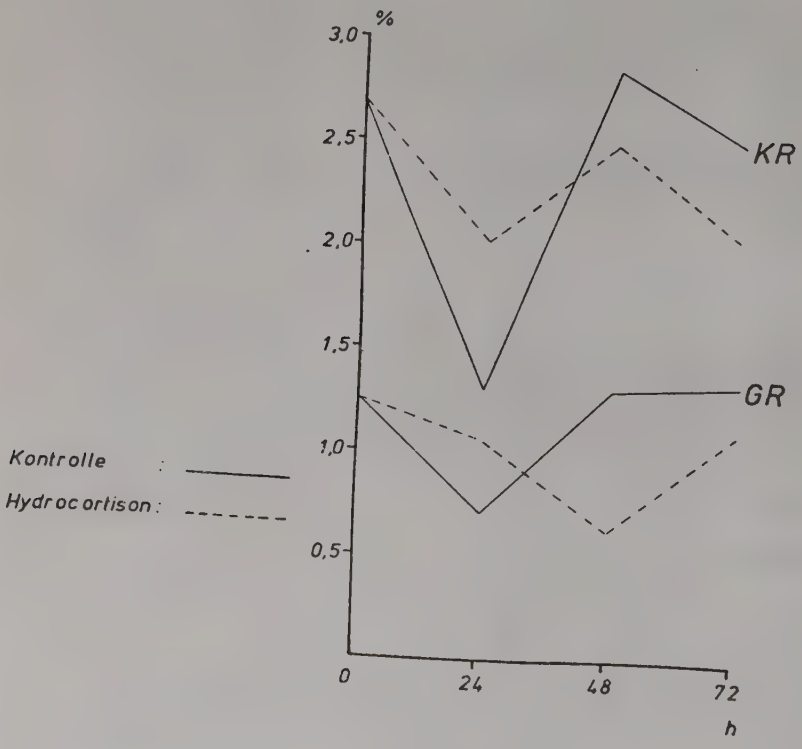


Abb.14 (Mittelwerte der Retikulumzellen)

GR = Große Retikulumzelle

KR = Kleine Retikulumzelle



Retikulumzellen in %

A) kleine Retikulumzellen

Tabelle 3a)

| Versuch | Kontrolle 0 h | Kontrolle 24 h | Kontrolle 48 h | Kontrolle 72 h | Corticosteron 24 h | Corticosteron 48 h | Corticosteron 72 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 4,52 | 1,66 | 3,44 | 1,90 | 3,17 | 2,54 | 2,65 |
| III | 3,39 | 2,22 | 0,99 | 2,06 | 1,67 | 1,97 | 3,28 |
| IV | 1,17 | 0,95 | 2,50 | 3,17 | 2,28 | 1,84 | 1,94 |
| V | 2,43 | 0,66 | 3,90 | 1.70 | 2,10 | 2,92 | 2,15 |
| Summe | 11,51 | 5,49 | 10,83 | 8,83 | 9,22 | 9,27 | 10,04 |
| Mittel-wert | 2,88 | 1,37 | 2,71 | 2,21 | 2,31 | 2,32 | 2,51 |

Tabelle 3b)

| Versuch | Kontrolle 0 h | Kontrolle 24 h | Kontrolle 48 h | Kontrolle 72 h | Hydrocortison 24 h | Hydrocortison 48 h | Hydrocortison 72 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| II | 3,73 | 1,36 | 4,00 | 3,12 | 1,81 | 3,36 | 1,70 |
| III | 3,39 | 2,22 | 0,99 | 2,06 | 2,86 | 2,15 | 2,92 |
| IV | 1,17 | 0,95 | 2,50 | 3,17 | 2,52 | 3,20 | 1,45 |
| V | 2,43 | 0,66 | 3,90 | 1,70 | 0,88 | 1,27 | 2,08 |
| Summe | 10,72 | 5,19 | 11,39 | 10,05 | 8,07 | 9,98 | 8,15 |
| Mittel-wert | 2,68 | 1,30 | 2,85 | 2,51 | 2,02 | 2,50 | 2,04 |

Retikulumzellen in %

B) große Retikulumzellen

Tabelle 3c)

| Versuch | Kontrolle 0 h | Kontrolle 24 h | Kontrolle 48 h | Kontrolle 72 h | Corticosteron 24 h | Corticosteron 48 h | Corticosteron 72 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 3,15 | 1,83 | 3,03 | 2,17 | 2,23 | 0,99 | 1,92 |
| III | 1,49 | 1,70 | 1,42 | 1,63 | 0,72 | 0,84 | 1,33 |
| IV | 0,44 | 0,28 | 0,59 | 0,99 | 1,02 | 0,99 | 0,87 |
| V | 0,86 | 0,42 | 1,86 | 1,15 | 1,15 | 1,73 | 0,86 |
| Summe | 5,94 | 4,23 | 6,90 | 5,94 | 5,12 | 4,55 | 4,98 |
| Mittelwert | 1,49 | 1,06 | 1,73 | 1,49 | 1,28 | 1,14 | 1,25 |

Tabelle 3d)

| Versuch | Kontrolle 0 h | Kontrolle 24 h | Kontrolle 48 h | Kontrolle 72 h | Hydrocortison 24 h | Hydrocortison 48 h | Hydrocortison 72 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| II | 2,21 | 0,42 | 1,33 | 1,54 | 0,86 | 0,85 | 0,85 |
| III | 1,49 | 1,70 | 1,42 | 1,63 | 1,02 | 0,82 | 1,09 |
| IV | 0,44 | 0,28 | 0,59 | 0,99 | 1,14 | 0,58 | 1,36 |
| V | 0,86 | 0,42 | 1,86 | 1,15 | 1,17 | 0,26 | 1,08 |
| Summe | 5,00 | 2,82 | 5,20 | 5,31 | 4,19 | 2,51 | 4,38 |
| Mittelwert | 1,25 | 0,71 | 1,30 | 1,33 | 1,05 | 0,63 | 1,10 |

Retikulumzellen: (Abb. 13 + 14)

Das Verhalten der Retikulumzellen unter Corticosteroideinfluß wird in den Tabellen 3a - c für die Mittelwerte der Retikulumzellen und mittels graphischer Darstellungen (Abb. 13 + 14) verdeutlicht.

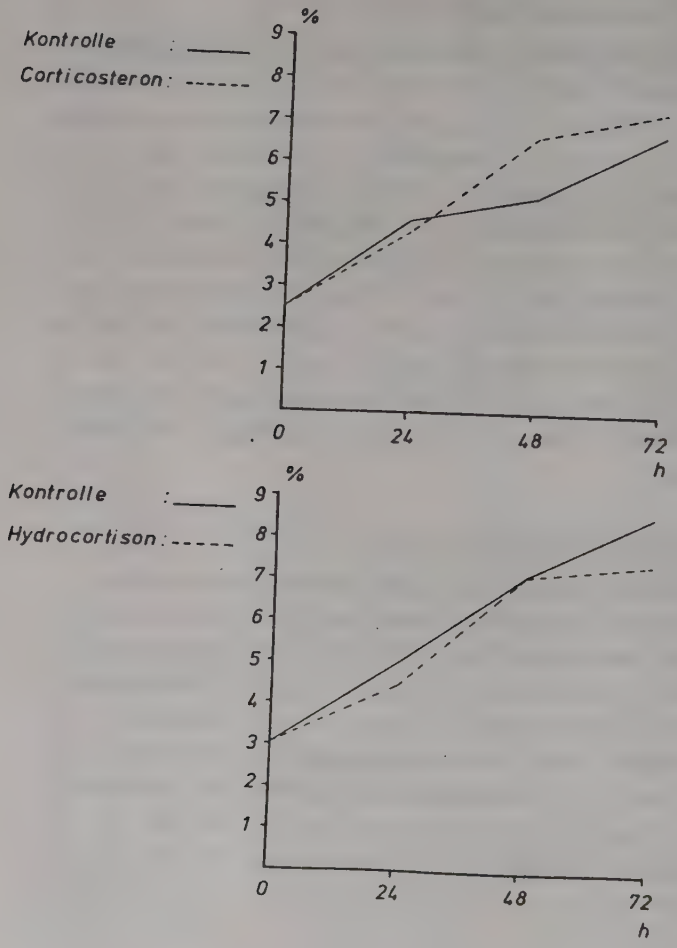
A) kleine Retikulumzellen (Tab. 3a + b)

Die Mittelwerte der Kontrollen für die Versuche mit Corticosteron - sowie auch mit Hydrocortisonzusätzen fallen nach 24 Stunden stark ab, um am zweiten Kultivierungstag wieder in etwa den Ausgangswert zu erreichen. Bis 72 Stunden erfolgt ein erneutes leichtes Absinken der %-Zahlen. Bei den Zusatzpräparaten ist die Zellzahl nach 24 Stunden weniger verringert. Unter Corticosteroneinfluß bleibt der Mittelwert bis 48 Stunden konstant, um dann bis 72 Stunden über den 24-Stunden-Wert anzusteigen. Der Hydrocortisonzusatz hingegen bewirkt schon am zweiten Versuchstag einen erneuten Anstieg der Zellzahl, um gleich der Kontrolle am letzten Kultivierungstag wieder abzufallen.

B) große Retikulumzellen (Tab. 3c + d)

Für diese Zellform ist der Unterschied zwischen Kontrolle und Zusatz nicht derart ausgeprägt wie bei den kleinen Retikulumzellen; die Wirkung beider Corticosteroide ist durchaus vergleichbar. Die Mittelwerte der Kontrollen fallen bis 24 Stunden ab, und steigen bis 48 Stunden wieder über den Ausgangswert hinaus an. Unter den jeweiligen Hormonzusätzen wird dieser Abfall der Mittelwerte bis zum Ende des zweiten Versuchstages verlängert, um dann in einen verzögerten Anstieg umzuschlagen.

Abb. 15 (Mittelwerte der Lymphozyten)



Lymphozyten in %

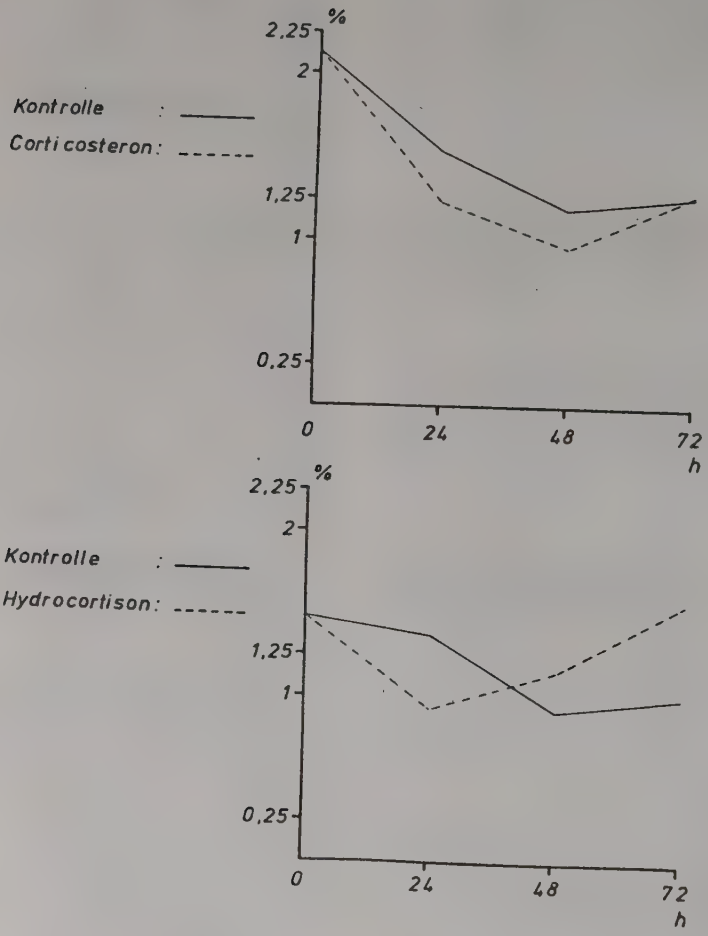
Tabelle 4a)

| Versuch | Kontrolle 0 h | Kontrolle 24 h | Kontrolle 48 h | Kontrolle 72 h | Corticosteron 24 h | Corticosteron 48 h | Corticosteron 72 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 2,10 | 1,83 | 3,77 | 1,86 | 3,82 | 3,34 | 3,39 |
| III | 2,49 | 4,21 | 7,51 | 8,50 | 6,12 | 8,61 | 4,61 |
| IV | 2,78 | 4,54 | 3,38 | 7,91 | 2,81 | 9,03 | 9,58 |
| V | 2,38 | 7,55 | 5,81 | 8,27 | 4,44 | 5,36 | 11,38 |
| Summe | 9,75 | 18,13 | 20,47 | 20,54 | 17,19 | 26,34 | 28,96 |
| Mittel-wert | 2,44 | 4,53 | 5,12 | 6,64 | 4,30 | 6,59 | 7,24 |

Tabelle 4b)

| Versuch | Kontrolle 0 h | Kontrolle 24 h | Kontrolle 48 h | Kontrolle 72 h | Hydrocortison 24 h | Hydrocortison 48 h | Hydrocortison 72 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| II | 4,38 | 3,62 | 7,90 | 9,87 | 5,90 | 11,59 | 13,00 |
| III | 2,49 | 4,21 | 7,51 | 8,50 | 5,00 | 5,81 | 6,57 |
| IV | 2,78 | 4,54 | 3,38 | 7,91 | 2,66 | 5,33 | 5,63 |
| V | 2,38 | 7,55 | 5,81 | 8,27 | 4,11 | 5,58 | 4,42 |
| Summe | 12,03 | 19,92 | 28,37 | 34,55 | 17,67 | 28,31 | 29,62 |
| Mittel-wert | 3,01 | 4,98 | 7,09 | 8,64 | 4,42 | 7,08 | 7,41 |

Abb.16 (Mittelwerte der Plasmazellen)



Lymphozyten : (Tab. 4a + b; Abb. 15)

Die Lymphozytenzellzahl nimmt während der drei Versuchstage sowohl in den Kontrollkulturen wie auch unter Corticosteron- bzw. Hydrocortisoneinfluß ständig zu. Die Wirkung beider Hormonzusätze muß jedoch nach mathematischer Überprüfung als zufällig angesehen werden. Lediglich am Ende des zweiten Versuchstages findet man bei der Corticosteron-Zusatzkultur eine signifikante Vermehrung der Lymphozyten gegenüber den Kontrollen. (Tab. 5/28)

Plasmazellen : (Abb. 16)

Aufgrund der niedrigen Absolutzahlen, besonders nach 48- und 72-stündiger Kultivierung, haben die Mittelwertskurven der Plasmazellen nur bedingten Wert.

Signifikanzberechnung:

Mit dem $x^2$-Verfahren nach H. PEARSON wollen wir mathematisch sichern, ob die unterschiedlichen Ergebnisse bei den Versuchen mit Corticosteron- bzw. Hydrocortisonzusatz gegenüber den Kontrollversuchen als rein zufällig anzusehen sind oder ob eine tatsächliche Wirkung des jeweiligen Hormons zugrunde liegt. Der $x^2$-Test wird für alle Werte der roten Reihe für die Versuche eins bis fünf angewandt. Er wird ebenfalls zur Signifikanzberechnung der Mitose-Indices und der retikulären und der lymphatischen Zellen herangezogen. Es wird jeweils die Signifikanz von zwei Zahlenreihen berechnet.

Dabei bedeuten:

a = Zellzahl in den Kontrollkulturen

b = Zellzahl in den Kulturen mit Corticosteron- bzw. Hydrocortisonzusätzen.

Vorausgesetzt, daß die Summe der Zellzahlenreihe 'a' sich erheblich von der Summe der Zellzahlenreihe 'b' unterscheidet, gilt für die Berechnung des Erwartungswertes (E) folgendes:

$$E = \frac{a + b}{\text{Summe } a + \text{Summe } b} \cdot \text{Summe } a \quad (\text{bzw. Summe } b)$$

Wenn Summe $a = a_1$ und Summe $b = b_1$ und

$a_1 + b_1 = c$ ist, so gilt für den Quotienten:

$$P = \frac{a + b}{c} \qquad E = P \cdot a_1 \text{ bzw. } b_1$$

$$x^2 = \frac{(a - E)^2}{E} \quad \text{bzw.} \quad \frac{(b - E)^2}{E}$$

$x^2$ ist eine Maßzahl, die eine Übereinstimmung oder Nichtübereinstimmung der beiden miteinander verglichenen Zahlenreihen angibt. Für den jeweils errechneten $x^2$-Wert kann man dann aus den $x^2$-Tafeln von BELITZ einen entsprechenden p - Wert (probability-Wahrscheinlichkeitswert) ablesen.

Es gelten folgende Bedingungen:

$p > 0{,}05$ Die Differenz zwischen beiden Zahlenreihen ist zufallsbedingt.

$p < 0{,}01$ Die Differenz zwischen beiden Zahlenreihen ist signifikant.

$p < 0{,}0027$ Die Differenz zwischen beiden Zahlenreihen ist hochsignifikant.

BEISPIEL für die Signifikanzberechnung

Versuch 2 Erythropoese $24^h$

| Zelltyp | Kontr. | Zusatz | Kontr.+Zusatz | P |
|---|---|---|---|---|
| PE | 5 | 8 | 13 | 0,0304 |
| bE | 15 | 18 | 33 | 0,0771 |
| pE | 20 | 61 | 81 | 0,1892 |
| oE | 0 | 0 | 0 | 0,0000 |
| rE | 150 | 151 | 301 | 0,7033 |
| | $a_1$= 190 | $b_1$=238 | c=428 | = 1,0000 |

| Zelltyp | E-Kontr. | E-Zusatz | $(B-E)^2/E$Kontr. | $(B-E)^2/E$Zusatz |
|---|---|---|---|---|
| PE | 5,8 | 7,2 | 0,11 | 0,08 |
| bE | 14,7 | 18,4 | 0,01 | 0,01 |
| pE | 35,9 | 45,0 | 7,04 | 5,70 |
| oE | 0,0 | 0,0 | 0,00 | 0,00 |
| rE | 133,6 | 167,4 | 2,01 | 1,60 |
| | $a'_1$=190,0 | $b'_1$=238,0 | $x^2_3$= 9,17 | $x^2_3$ = 7,39 |

$$x^2 = \frac{(B-E)^2}{E_{ges}}$$

B = Beobachtungswert

E = siehe oben

P = siehe oben

| Zelltyp | $(B-E)^2/E_{ges}$ |
|---|---|
| PE | 0,19 |
| bE | 0,02 |
| pE | 12,74 |
| oE | 0,00 |
| rE | 3,61 |
| | $x^2_3$ = 16,56 |

$p = 2{,}8 \times 10^{-3}$ signifikant

Erläuterung zu Tabelle 5

Für den Zusatz Corticosteron gilt das Symbol C, für Hydrocortison H.

Versuch 1

Erythropoese

| Zelltyp | 24 Stunden Kontr. | ZusatzC | $(B-E)^2/E$ | 48 Stunden Kontr. | ZusatzC | $(B-E)^2/E$ | 72 Stunden Kontr. | ZusatzC | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PE | 8 | 5 | 1,41 | 2 | 1 | 0,88 | | | |
| bE | 44 | 50 | 0,08 | 7 | 6 | 0,99 | 6 | 4 | 0,19 |
| pE | 70 | 149 | 17,29 | 22 | 27 | 0,43 | 15 | 11 | 0,16 |
| oE | 4 | 4 | 0,43 | | | | | | |
| rE | 191 | 159 | 9,51 | 87 | 141 | 0,42 | 87 | 80 | 0,08 |
| | $a_1 = 317$ | $b_1 = 367$ | $x^2_4 = 28,72$ | $a_1 = 118$ | $b_1 = 175$ | $x^2_3 = 2,72$ | $a_1 = 108$ | $b_1 = 95$ | $x^2_2 = 0,43$ |
| | $p = 1x10^{-5}$ signifikant | | | $p = 5,9x10^{-1}$ nicht signifikant | | | $p = 7,8x10^{-1}$ nicht signifikant | | |

Versuch 2

Erythropoese

| Zelltyp | 24 Stunden Kontr. | ZusatzH | $(B-E)^2/E$ | 48 Stunden Kontr. | ZusatzH | $(B-E)^2/E$ | 72 Stunden Kontr. | ZusatzH | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PE | 5 | 8 | 0,19 | 6 | 8 | 0,22 | 2 | 0 | 0,43 |
| bE | 15 | 18 | 0,02 | 10 | 9 | 2,07 | 6 | 3 | 0,13 |
| pE | 20 | 61 | 12,74 | 26 | 18 | 9,47 | 14 | 20 | 11,70 |
| oE | 0 | 0 | | 2 | | 3,42 | | | |
| rE | 150 | 151 | 3,61 | 68 | 158 | 4,27 | 106 | 36 | 2,53 |
| | $a_1 = 190$ | $b_1 = 238$ | $x^2_3 = 16,56$ | $a_1 = 112$ | $b_1 = 193$ | $x^2_4 = 19,45$ | $a_1 = 128$ | $b_1 = 59$ | $x^2_4 = 14,79$ |
| | $p = 2,8x10^{-3}$ signifikant | | | $p = 5,5x10^{-4}$ signifikant | | | $p = 5x10^{-3}$ signifikant | | |

Tabelle 5/1-6

Versuch 3

Erythropoese

24 Stunden

| Zelltyp | Kontr. | Zusatz C | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|
| PE | 24 | 20 | 1,32 |
| bE | 53 | 81 | 2,17 |
| pE | 201 | 246 | 0,16 |
| oE | 6 | 12 | 1,14 |
| rE | 276 | 301 | 0,87 |
| | $a_1$ =560 | $b_1$ =660 | $x^2_4$= 5,66 |

p= $2,4 \times 10^{-1}$ nicht signifikant

48 Stunden

| Kontr. | Zusatz C | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|
| 7 | 1 | 7,78 |
| 17 | 6 | 11,59 |
| 28 | 17 | 9,94 |
| 1 | 5 | 5,92 |
| 164 | 307 | 3,86 |
| $a_1$ =217 | $b_1$ = 336 | $x^2_4$= 39,09 |

p= $9,8 \times 10^{-5}$ signifikant

24 Stunden

| Zelltyp | Kontr. | Zusatz H | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|
| PE | 24 | 7 | 3,23 |
| bE | 53 | 20 | 3,60 |
| pE | 201 | 84 | 9,49 |
| oE | 6 | 1 | 1,70 |
| rE | 276 | 234 | 12,94 |
| | $a_1$ =560 | $b_1$ =346 | $x^2_4$ =30,96 |

p= $2 \times 10^{-6}$ signifikant

48 Stunden

| Kontr. | Zusatz H | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|
| 7 | 8 | 0,11 |
| 17 | 10 | 3,40 |
| 28 | 31 | 0,11 |
| 1 | 0 | 1,18 |
| 164 | 213 | 0,48 |
| $a_1$ =217 | $b_1$ = 262 | $x^2_4$= 5,28 |

p= $2,3 \times 10^{-1}$ nicht signifikant

Tabelle 5/7-10

Versuch 4

Erythropoese

24 Stunden

| Zelltyp | Kontr. | Zusatz C | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|
| PE | 5 | 4 | 0,04 |
| bE | 17 | 17 | 0,05 |
| pE | 46 | 54 | 1,39 |
| oE | | | |
| rE | 178 | 153 | 0,48 |
| | $a_1$ = 246 | $b_1$= 228 | $x^2_3$=1,96 |

p =$5,8x10^{-1}$ nicht signifikant

48 Stunden

| Kontr. | Zusatz C | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|
| 7 | 3 | 1,97 |
| 13 | 13 | 0,04 |
| 44 | 68 | 1,87 |
| 193 | 196 | 0,48 |
| $a_1$=257 | $b_1$= 280 | $x^2_3$= 4,36 |

p = $3,6x10^{-1}$ nicht signifikant

24 Stunden

| Zelltyp | Kontr. | Zusatz H | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|
| PE | 5 | 15 | 2,07 |
| bE | 17 | 28 | 0,16 |
| pE | 46 | 150 | 2,41 |
| oE | | | |
| rE | 178 | 168 | 1,64 |
| | $a_1$ = 248 | $b_1$= 361 | $x^2_3$=6,28 |

p =$1x10^{-1}$ nicht signifikant

48 Stunden

| Kontr. | Zusatz H | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|
| 7 | | 2,45 |
| 13 | 1 | 2,28 |
| 44 | 4 | 2,85 |
| 193 | 78 | 2,85 |
| $a_1$=257 | $b_1$= 83 | $x^2_3$= 14,39 |

p = $6x10^{-3}$ signifikant

Tabelle 5/11-14

Versuch 5

Erythropoese

| Zelltyp | 24 Stunden Kontr. | Zusatz C | $(B-E)^2/E$ | 24 Stunden Kontr. | Zusatz H | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PE | 8 | 2 | 4,34 | 8 | 24 | 1,15 |
| bE | 7 | 12 | 0,80 | 7 | 36 | 0,04 |
| pE | 39 | 22 | 6,88 | 39 | 10 | 15,78 |
| oE | | | | | | |
| rE | 282 | 340 | 0,86 | 282 | 300 | 1,79 |
| | $a_1$=-336 | $b_1$= 376 | $x^2_3$= 12,88 | $a_1$=336 | $b_1$ = 320 | $x^2_3$=18,76 |
| | $p = 5 \times 10^{-3}$ signifikant | | | $p = 3 \times 10^{-4}$ signifikant | | |

Tabelle 5 /15+16

Beispiel für die Signifikanzberechnung der Mitosen

24 Stunden — weiße Reihe

| Versuch | Kontrolle | | | Zusatz | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 37 | - | 1533 | 24 | - | 1204 |
| 3 | 7 | - | 1002 | 15 | - | 1159 |
| 4 | 7 | - | 793 | 11 | - | 945 |
| 5 | 13 | - | 1151 | 9 | - | 570 |
| | $B_M$=64 | | $B_{M+N}$=4479 | $B_N$=59 | | $B_{M+N}$=3878 |

| | $B_M$ | $B_N$ | $B_{M+N}$ | $E_M$ | $E_N$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Ko | 64 | 4415 | 4479 | 65,9 | 4413,1 |
| Zu | 59 | 3819 | 3878 | 57,1 | 3820,9 |
| Su | 123 | | 8357 | | |

Ko: $E_M = \frac{123 \times 4479}{8357} = 65,9$

$E_N = 4479 - 65,9 = 4413,1$

Zu: $E_M = \frac{123 \times 3878}{8357} = 57,1$

$E_N = 3878 - 57,1 = 3820,9$

Ko: $B_M - E_M = 1,9$ $\quad \frac{(B-E)^2}{E} = 0,055$

$B_N - E_N = 1,9$ " $= 0,001$

Zu: $B_M - E_M = 1,9$ " $= 0,063$

$B_N - E_N = 1,9$ " $= 0,001$

$x_1^2 = 0,12$

Ko = Kontrolle
Zu = Zusatz
Su = Summe
$B_M$ = Beobachtungswert Mitosen
$B_N$ = Beobachtungswert Nichtmitosen
$E_M$ = Erwartungswert Mitosen
$E_N$ = Erwartungswert Nichtmitosen
$B_{M+N}$ = Beobachtungswert Mitosen + Nichtmitosen
$E_M$ = Su. d. Mitosen
Su. d. Gesamtzahl multipliziert mit $B_{M+N}$
$E_N = B_{M+N} - E_M$
p = Wahrscheinlichkeitswert
$x_1^2 = \frac{(B-E)^2}{E}$
p 0,01
nicht signifikant

Rote Reihe:

24, 48 Stunden (Zusätze Corticosteron, Hydrocortison)

$x_1^2 = 1$ p = 0,01 nicht signifikant

Weiße Reihe:

24 Stunden (Zusatz Hydrocortison)

$x_1^2 = 0,12$ p = 0,01 nicht signifikant

Tab. 5/17-19

$x^2$ - Test für die großen Retikulumzellen

| | Versuch | Kontr. | Zusatz C | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|---|
| 24 Std. | 1 | 42 | 48 | |
| | 2 | | | |
| | 3 | 36 | 15 | 12,14 |
| | 4 | 6 | 21 | 6,28 |
| | 5 | 9 | 24 | 4,79 |
| | | $a_1$=93 | $b_1$=108 | $x^2_2$=23,21 |

$p = 3,6 \times 10^{-5}$ signifikant

| | Kontr. | Zusatz C | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|
| 72 Std. | 48 | 42 | 0,32 |
| | 9 | 15 | 3,44 |
| | 21 | 9 | 2,30 |
| | 25 | 14 | 1,10 |
| | $a_1$=103 | $b_1$=80 | $x^2_3$=7,16 |

$p = 6 \times 10^{-2}$ nicht signifikant

| | Versuch | Kontr. | Zusatz H | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|---|
| 24 Std. | 1 | | | |
| | 2 | 9 | 18 | 0,63 |
| | 3 | 36 | 21 | 12,09 |
| | 4 | 6 | 24 | 5,38 |
| | 5 | 9 | 24 | 2,50 |
| | | $a_1$ = 60 | $b_1$= 87 | $x^2_3$= 20,60 |

$p = 1,5 \times 10^{-4}$ signifikant

| | Kontr. | Zusatz H | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|
| 72 Std. | 36 | 9 | 4,20 |
| | 9 | 12 | 4,75 |
| | 21 | 15 | 0,81 |
| | 25 | 12 | 0,07 |
| | $a_1$=91 | $b_1$=48 | $x^2_3$= 9,83 |

$p = 2 \times 10^{-2}$ signifikant

Tabelle 5 /20-23

$x^2$ - Test für die kleinen Retikulumzellen

| | Versuch | Kontr. | Zusatz C | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|---|
| 48 Std. | 1 | 75 | 54 | 1,20 |
| | 2 | | | |
| | 3 | 21 | 42 | 10,05 |
| | 4 | 51 | 39 | o,42 |
| | 5 | 82 | 66 | o,27 |
| | | $a_1$= 229 | $b_1$= 201 | $x^2_3$= 11,94 |
| | | p = 8 x $10^{-2}$ | nicht signifikant | |

| | Kontr. | Zusatz C | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|
| 72 Std. | 42 | 58 | 3,61 |
| | 11 | 37 | 15,31 |
| | 67 | 20 | 23,31 |
| | 37 | 35 | 0,02 |
| | $a_1$=157 | $b_1$=150 | $x^2_3$=42,25 |
| | p = $10^{-3}$ | signifikant | |

| | Versuch | Kontr. | Zusatz H | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|---|
| 48 Std. | 1 | | | |
| | 2 | 90 | 71 | 0,18 |
| | 3 | 21 | 47 | 19,81 |
| | 4 | 51 | 33 | 0,30 |
| | 5 | 82 | 29 | 12,11 |
| | | $a_1$= 244 | $b_1$= 180 | $x^2_3$= 32,40 |
| | | p = 3 x $10^{-7}$ | signifikant | |

| | Kontr. | Zusatz H | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|
| 72 Std. | 73 | 18 | 6,37 |
| | 11 | 32 | 35,29 |
| | 67 | 16 | 6,29 |
| | 37 | 23 | 1,06 |
| | $a_1$=188 | $b_1$ =89 | $x^2_3$=49,01 |
| | p = 75 x $10^{-10}$ | signifikant | |

Tabelle 5 /24-27

$x^2$ - Test für die Lymphozyten

48 Stunden

| Versuch | Kontr. | Zusatz C | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|---|
| 1 | 82 | 71 | 5,09 |
| 2 | | | |
| 3 | 159 | 184 | 2,06 |
| 4 | 69 | 191 | 2,96 |
| 5 | 122 | 121 | 4,80 |
| | $a_1$=432 | $b_1$=567 | $x^2_3$=14,91 |

$p = 2 \times 10^{-3}$ signifikant

72 Stunden

| Kontr. | Zusatz H | $(B-E)^2/E$ |
|---|---|---|
| 231 | 138 | 0,81 |
| 188 | 144 | 1,89 |
| 167 | 124 | 1,04 |
| 180 | 98 | 2,29 |
| $a_1$=766 | $b_1$=504 | $x^2_3$=6,03 |

$p = 1,1 \times 10^{-1}$ nicht signifikant

Tabelle 5/ 28+29

Z U S A M M E N F A S S U N G der Ergebnisse:

Für unsere Versuchsreihe wurde Knochenmark von fünf Patienten verwendet. Je vier Knochenmarkproben wurden auf die Änderung der Proliferationsaktivität unter Corticosteron-, je vier auf die unter Hydrocortisoneinfluß in vitro untersucht. Keiner der Knochenmarkspender war zur Zeit der Sternalpunktion einer Corticosteroidtherapie ausgesetzt.
Die Ergebnisse waren folgende:

1) Reifung

a) Reifungskurven

In der Erythropoese wurde die Zellausreifung durch einen Zusatz von 0,25 µg/ml Corticosteron nur unbedeutend beeinflußt, was besonders durch die Reifungskurven der Versuche 4 und 5, sowie durch die mittleren Reifungskurven verdeutlicht wird (Abb. 5+7+9). Mathematisch wurde gesichert, daß die Abweichungen der Zusatzkurven gegenüber den Kontrollen meist zufällig auftreten.
Bei den Versuchen, bei denen Hydrocortison in gleicher Konzentration zugesetzt wird, sehen wir schon beim optischen Vergleich der Mittelwertskurven eine ähnliche Beeinflussung wie beim Corticosteronzusatz (Abb. 9+10); die Abweichungen sind ausgeprägter. Unter Berücksichtigung der Signifikanzberechnungen, besonders der Versuche 2 und 4 (Tab. 5/4+5+6; Tab. 5/12+14), kann man sagen, daß während des zweiten Kulturtages eine signifikante Reifungsförderung einsetzt, die während des letzten Versuchstages, wenn auch abgeschwächt, anhält.

Die gemittelten Reifungskurven für die Granulopoese zeigen, daß die prozentuale Abweichung der Zusatzkurven von den Kontrollkurven relativ noch geringer ist als in der Erythropoese (Abb. 9+10). Wertet man jedoch die drei Doppelfälle, die einen direkten Vergleich der Corticosteron- und der Hydrocortisonwirkung gestatten, gesondert, so wird eine gegensätzliche Wirkung der Hormonzusätze sichtbar (s. Kurve 10 b). Während Corticosteron die Rei-

fung der weißen Reihe deutlich hemmt, bewirkt Hydrocortison, am ausgeprägtesten nach 24 Stunden, eine Reifungsförderung.

b) G/E- Indices (Tab. 1a + b)

Die Mittelwerte der G/E- Indices liegen bis auf den 72-Stundenwert bei den Kulturen mit Hydrocortisonzusatz zu allen Zeiten unter den entsprechenden Kontrollwerten. Dies bestätigt die Reifungsförderung der Erythropoese, die besonders unter Hydrocortisoneinfluß nach Auswertung der Reifungskurven angenommen worden war.

2) Regeneration

a) Mitoseindices

Für beide Corticosteroidzusätze läßt sich aus der Tabelle (Tab. 2a +b) für die Mitoseindices der roten Reihe eine regenerationshemmende Wirkung ablesen, die jedoch mathematisch nicht nachweisbar ist. (Tab. 5/17 + 18) Unter Corticosteron wird die Regeneration der Granulopoese nur wenig beeinflußt. Eine klare Tendenz ist nicht zu erkennen. (Tab. 2c) Hydrocortison bewirkt während der gesamten Versuchsdauer eine sehr geringe, nicht signifikante Regenerationsförderung. (Tab. 2d; Tab. 5/19)

b) karyologische Kurve (Abb. 11+12)

Die karyologischen Kurven weichen unter dem Einfluß des jeweiligen Corticosteroidzusatzes nicht eindeutig voneinander ab. In der Erythropoese konnten zu wenig Mitosen differenziert werden, um der Kurve Aussagekraft zu verleihen (Abb. 11). In der Granulopoese zeigt sich eine geringe Verschiebung zu den Metaphasen.

3) Retikuläres Gewebe (Abb. 14 + 15)

Die großen und die kleinen Retikulumzellen sind unter beiden Hormonzusätzen jeweils nach 24 Stunden relativ vermehrt und nach 48 Stunden vermindert. Diese Werte sind mathematisch gesichert. (Tab. 5/20 + 21; Tab. 5/24 + 25)

Bei den kleinen Retikulumzellen finden wir dagegen unter Corticosteroneinfluß eine signifikante Zellvermehrung nach 72 Kulturstunden, während der Hydrocortisonzusatz den gegenteiligen Effekt bewirkt (Tab. 5/26+27).

4) Lymphopoese (Abb. 15; Tab. 4a + b)

Die Lymphopoese bleibt durch beide Hormonzusätze über die gesamte Versuchsdauer weitgehend unbeeinflußt. Der einmalige signifikante Anstieg der Lymphozytenzahl unter Corticosteroneinfluß bei 48 Stunden kann das ansonsten klare Gesamtbild nicht widerlegen. (Tab. 5/ 28+29).

5) Plasmazellen

Die niedrigen Absolutzahlen für diese Zellform lassen eine Aussage über eine etwaige Beeinflussung durch unsere Hormonzusätze nicht zu.

D I S K U S S I O N :

Eine Reifungsförderung der Erythropoese, wie sie von WILDE und SCHELLACK [52, 48] mit Dexamethasonsulfat bzw. Prednisolonacetat erzielt wurde, konnte in unseren Versuchsserien mit Hydrocortison, weniger ausgeprägt mit Corticosteron, signifikant nachgewiesen werden. Analog zu ihren Ergebnissen beobachteten wir eine geringere Beeinflussung der Granulopoese im Sinne einer Reifungshemmung durch Corticosteron- und einer Reifungsförderung bei Hydrocortisonzusatz. Zu durchaus vergleichbaren Ergebnissen in bezug auf eine Proliferationsförderung gelangten andere Autoren bei in vivo-Versuchen [46, 53] und an Fibroblastenkulturen [37, 32, 40].

Gegensätzliche Ergebnisse, nämlich eine Proliferationshemmung menschlicher Erythro- und Granuloblasten, erzielten WEISSENFELS und BOLL [57], THOMAS und SEIDLER [51], DARZYNKIEWICZ und PIENKOWSKI [14]. Ähnliche Beobachtungen wurden am Knochenmark bei Versuchstieren gemacht [12, 28]. Einer Proliferationshemmung humaner Knochenmarkkulturen entsprechende Resultate bei anderen Zellkulturen sind schon seit langem bekannt: bei Fibroblasten [37, 41, 49] und Malignomzellen [20, 24], aber auch an menschlichen Leberzellen [56].

Es scheint schwierig, eine definitive Erklärung für diese unterschiedliche Effektivwirkung der jeweiligen Corticosteroide zu finden. Hierbei wird augenfällig, daß einerseits häufig eine Diskrepanz in den Ergebnissen zwischen vergleichbaren in vivo und in vitro-Versuchen besteht, andererseits wurde auch bei in vitro-Versuchen mit verschiedenen Corticosteroiden bei gleicher Methodik und gleicher Dosis keine einheitliche Beeinflussung der Proliferation von Knochenmarkzellen gesehen [42, 57, 58].

Folgen wir WEISSENFELS und BOLL [57], so besteht neben der direkten Beeinflussung der Hämatopoese durch Corti-

costeroide die Möglichkeit, daß diese Hormone in vivo über nervale und humorale Faktoren eine zusätzliche Stimulation der Blutbildung induzieren. Für die Existenz derartiger übergeordneter Regelkreise gibt es einige Hinweise \57, 42\.

Obwohl gleichsinnige Dosis-Wirkungs-Relationen nachgewiesen wurden [49, 18, 28], sehen einige Autoren als Ursache für die unterschiedlichen Resultate bei Experimenten mit Fibroblastenkulturen, daß meist nicht vergleichbare Corticosteroiddosen verwandt wurden [40, 32, 37]. Wieder andere weisen auf einen unterschiedlichen antiinflammatorischen Effekt der Corticosteroide hin [29, 50].

Während eine sicher proliferationshemmende Wirkung der Corticosteroide auf Fibroblastenkulturen bei unphysiologisch hoher Dosierung schon lange bekannt ist [21, 22, 26, 49] , fanden UNDRICOV [54] , RASCHE [37], ROZEN [40] und MACIEIRA [32] bei niedriger Dosierung eine Überlebensverlängerung bzw. Wachstumsförderung bei Fibroblastenkulturen. Diese 'paradoxe' Wirkung des Cortisons sahen wir bei der menschlichen Hämatopoese; denn eine der physiologischen Konzentration entsprechende Dosierung von 0,25 µg/ml Hydrocortison bewirkt in vitro eine signifikante Reifungsförderung der Erythropoese ab 48 Stunden, außerdem eine Reifungsförderung der Granulopoese während der gesamten Versuchsdauer. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von G. WILDE [58] und A. SCHELLACK [42] .

Eine Hemmung der Regeneration proportional zur Höhe der Steroiddosis, welche von einer bestimmten Höhe an zu einem völligen Mitosestop führt, ist unbestritten [31,17,45] Wir erreichten mit unserer Konzentration von 0,25 µg/ml Corticosteron bzw. Hydrocortison wie andere Autoren auch [57, 42] eine Regenerationshemmung der Erythropoese. Diese Hemmung ist wahrscheinlich durch Verzögerung des Mitoseablaufes ausgeprägter als es der Mitoseindex kennzeichnet. Analog zu WEISSENFELS und BOLL [57] , sowie WILDE [58] und A. SCHELLACK [42] sehen wir bei der Auswertung der karyologischen Kurven eine Verschiebung zu

den späten Metaphasen, was auf eine verstärkte Hemmung der nachfolgenden Mitosephase schließen läßt. Bei Untersuchungen an Fibroblastenkulturen beobachtete TAIFOUR [49] eine vergleichbare Anhäufung von Metaphasenplatten, insbesondere bei niedrigen Steroiddosen.

Es wäre durchaus denkbar, daß die Wirkung der Corticosteroide auf die Zellregeneration mit ihrem sogenannten antiinflammatorischen Effekt in Relation zu bringen ist. So beschrieben WEISSENFELS und BOLL [57] , daß der antiinflammatorische Effekt von Triamcinolon und Prednisolonsulfat mit der jeweiligen regenerationshemmenden Wirkung auf das hämatopoetische System durchaus korreliert. Das nach KAISER [29] 1,3-fach stärkere Triamcinolon bewirkte auch den eindeutig besseren regenerationshemmenden Effekt. Vergleichen wir die von uns verwandten Glucocorticoide Corticosteron und Hydrocortison, so wirkt das eindeutig schwächere Corticosteron bei gleicher Dosierung in vitro gleichfalls hemmend auf die Regeneration der Erythropoese. In der Granulopoese verzeichnen wir unter Hydrocortisoneinfluß jedoch einen geringeren Mitoseanstieg. Da Dexamethason gegenüber dem Triamcinolon 4-mal, gegenüber dem Hydrocortison zwanzigmal an Bindegewebswirkung überlegen ist, dennoch bei gleicher Dosierung keine Proliferationshemmung wie Triamcinolon, sondern eine signifikante Regenerationsförderung erbrachte, scheint eine Korrelation zwischen dem sogenannten antiinflammatorischen Effekt der Corticosteroide und ihrer Wirkung auf die Hämatopoese unwahrscheinlich.

Sicherlich ist die effektive Wirkung der Corticosteroide nicht völlig von einzelnen Komponenten wie Konzentration, Expositionsdauer und antiinflammatorischem Effekt zu trennen; alle Wirkfaktoren gehen in irgendeiner Weise als Summanden in die Effektivrechnung ein.

Die Tatsache, daß beim Vergleich unserer Versuche mit anderen Experimenten [42, 57, 58] , obwohl mit der gleichen Konzentration und gleicher Methodik gearbeitet wurde, eine unterschiedliche, sogar gegensätzliche Beeinflussung der

Hämatopoese erreicht wurde, läßt darauf schließen, daß jedem Corticosteroid ein spezifischer pharmakokinetischer Effekt obliegt. Dabei stimmen wir mit RAPPAY, FAZEKAS und GYÉVAI [36] überein, die hierin eine Erklärung für die unterschiedliche Beeinflussung von Fibroblastenkulturen durch Corticosteroide sehen. Denkbar wäre z.B. ein unterschiedlicher Angriffspunkt an der Zelle selbst; es gibt biochemische Hinweise, daß einige Corticosteroide, darunter auch Hydrocortison, nach Ankoppelungsvorgängen direkt auf die DNS-Synthese einwirken [13, 20] . Gehen wir davon aus, daß jedes Corticosteroid einen spezifischen pharmakodynamischen Effekt besitzt, und sehen wir diesen als eine Hauptkomponente für die spezifische Wirkungsweise des jeweiligen Hormons an, dann wäre damit ihre unterschiedliche Effektivität, speziell auf die Hämatopoese, verständlich.

## Z U S A M M E N F A S S U N G der Arbeit:

In je vier Versuchen wird das Verhalten von menschlichen Knochenmarkzellen unter Einwirkung von 0,25 µg/ml Corticosteron bzw. Hydrocortison im Bezug auf eine veränderte Zellproliferation in vitro untersucht.
Es wird nachgewiesen, daß Hydrocortison eine signifikante Reifungsförderung der Erythropoese bewirkt, Corticosteron hingegen ihre Zellreifung nicht signifikant verändert.
Die Reifung der Granulopoese wird ebenso durch Hydrocortison gefördert, während sie durch Corticosteron gehemmt wird.
Die Regeneration der Erythropoese wird durch beide Hormonzusätze vermindert, die der Granulopoese kaum beeinflußt.

Das lymphatische Gewebe bleibt durch beide Glucocorticoide unbeeinflußt.

## L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1.ADDISON, Th.: On the disease of supraadrenal capsules. Lond. med. Gaz. 43 (1855)

2.BASERGA, A., u.M.MORSIANI: Regeneration des lymphatischen Gewebes nach Prednison. Schweiz. med. Wschr. 91, 1190 (1961)

3.BATRA, KARAM V., LLOYD M.ELROD and R.SCHREK: Species differences in the in vitro sensitivity of lymphocytes to prednisolone and x-rays. J.Pharm. exp. Ther. 152: 525-28 (1966)

4.BELITZ, H.-J.: Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. Sonderdruck aus "Der Mathematikunterricht", (Klett Stuttgart) Heft 3 (1960)

5.BIEDL, A.: Innere Sekretion, 2, 1-76 (1913)

6.BOLL, I., G. MERSCH, S.SCHOEN, U.GÖTTKE, D.BOXHEIMER, G.LUCKE : Hormoneinwirkung auf die Proliferationskinetik humaner Knochenmarkkulturen. Klin. Wschr. 46: 608 (1968)

7,BOLL, I., und G. FUCHS : Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro. Blut VII, 257 (1961).

8.BOLL, I. : Über die Behandlung der akuten Leukämie mit Folsäure-Antagonisten und ACTH unter Berücksichtigung eines eigenen Falles. Ärztl. Wschr. 8, 21/22, 516 (1953).

9.BOLL, I. und G. MERSCH : Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro. Blut XVII, 193 (1968)

10.BOLL, I. und G. MERSCH : Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulopoese in vitro. Blut XIX, 257 (1969)

13.COX, R.P., MACLEOD, C.M.:
J.gen.Physiol. 45, 439 (1962)

14.DARZYNKIEWICZ, Z.,M. PIENKOWSKI : Effect of prednisolon on RNA- synthesis in human lymphocytes by phytohaemagglutinin.
Exp. Cell. Res. 54 : 289 (1969)

15.ELVES, M.W., J.GOUGH, M.C.G. ISRAELS : The place of the lymphocyte in the reticulo-endothelial system.
A study of the in vitro effect of prednisolone on lymphocytes.
Acta haemat. 32 : 100 (1964)

16.FARNES, P., BARKER, B.E.:
Metabolism 14, 75 (1965)

17.FLEISCHER, J.: Die Wirkung längerer Gaben von Prednisolon und Endoxan auf das Knochenmark des Kaninchens.
Folia haemat., N.F., 7 : 323 (1963)

18.FRANKFURT, O.S.: Effect of hydrocortisone, adrenalin and actinomycin D on transition of cells to the DNA synthesis phase.
Exp. Cell. Res. 52, 220 (1968)

19.GABOUREL, I.D. and L.ARNOW : Growth inhibition of hydrocortisone on mouse lymphoma ML-388 in vitro.
J. Pharm. exp. Ther. 136, 213 (1962)

20.GABOUREL, I., L.ARNOW : zitiert nach: U. HECKMANN: Zur Prednisolonwirkung auf Malignomzellen in der Gewebekultur.
Med. Welt, N.F., 18 : 483 (1967)

21.GILLETTE, R. u. R.BUCHSBAUM : Some effects of desoxycorticosteron glycoside on chick fibroblast in vitro.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 83, 30 (1953)

22.GROSSFELD, H. and ROGAN, C.: Action of hydrocortisone on cells in tissue culture.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1954 86, 63

23.HALVORSEN, S.: Effects of ACTH on erythropoesis in the rabbit.
Acta physiol. scand. 58, 30 (1970)

24.HECKMANN, U.: Zur Prednisolonwirkung auf Malignomzellen in der Gewebekultur.
Med. Welt, N.F., 18 : 483 (1967)

25.HENCH, P.S., E.C. KENDALL, C.H.SLOCUMB, H.F.POLLY: The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosteron: Compound E) and pituitary adrenocorticotropic hormone on rheumatoid arthritis.
Proc. staff.Meet. Mayo Clin.24 : 181 (1949)

26.HOLDEN, M., L.B. ADAMS: inhibitory effects of cortisone acetate and hydrocortisone on growth of fibroblasts.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91,364 (1957)

27.HOUSSAY, B.A. and J.T. LEWIS,
Amer. J. Physiol. 64, 512 (1923)

28.HUNSTEIN, W., M.STREY : Zur Wirkung von Prednisolon auf die H-Thymidin-Einbaurate in Knochenmarkzellen von Ratten.
Klin. Wschr. 43 : 52 (1965)

29.KAISER, H.: Cortisonderivate in Klinik und Praxis
4. Aufl., (Thieme, Stuttgart 1965)

30.KUMMER, D., H.D. OCHS : Cytostatische Wirkungen von Cortisol und verwandten Steroiden.
Z. physiol. Chem. 1, 349 (1968)

31.KUSCHINSKY, G. und H. LULLMANN: Pharmakologie
5. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

32.MACIEIRA, C.A.: Action of cortisone on human fibroblast in vitro.
Experientia 22, No. 6, 390 (1961)

33.MORRISON, J.H., TOEPFER, J.R.: Cellular changes in the bone marrow following chronic treatment of rats with cortisol.
Acta haemat. 38, 250 (1967)

34.NOWELL, P.C.: Inhibition of human leucocyte mitosis by prednisolone in vitro.
Cancer Res. 21 : 1518 (1961)

35.PESCHLE, C., CONDORELLI, M. : Studies on the effects of hormones on erythropoesis in mice.
13. Intern. Haemat.Kongr. München 1970
Ste.11

36.RAPPAY, Gy., FAZEKAS, I. and A. GIEVAI : Effects of hydrocortisone on growth in vitro of fibroblastlike (Fl) cells derived from rat organs.
Acta Med. acad. Sci. Hung., Tomas 25 (3-4) pp 451-456 (1968)

37.RASCHE, B., W.T.ULMER : Glucocorticoidwirkung auf Wachstum und Stoffwechsel permanenter Fibroblastenkulturen in Abhängigkeit von der Konzentration und Expositionsdauer.
Z. Zellforschung 84, 506 (1968)

38.REICHSTEIN, T., E.LAQUEUR, I.E.UYLDERT, P.R.DE FREMERY und R.W.APANHOFF,
Kon.Akad. Wetensch., Amsterdam, (Proc.39, 1218/1936)

39.ROHR, K.: Das menschliche Knochenmark.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1960)

40.ROZEN, W.B., L.S. CHERNIN: The effect of various glucocorticoid doses on the growth of single layer connective tissue cultures.
Pathol. Fiziol. Eksp. Therapiya 8, No. 5, 59 (1964)

41.RUHRMANN, G., BERLINER, D.L.: Effects of steroids on growth of mouse fibroblasts in vitro. Endocrinology 76, 916 (1965)

42.SCHELLACK, A.:Die Einwirkung von Prednisolonsulfat auf menschliches Knochenmark in vitro. Diss. im Druck

43.SCHREK, R.: Cytotoxicity of adrenal cortex hormons on normal and malignant lymphocytes of man and rat. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 108: 328 - 332, 1961

44.SEIFERT, R., NILZ, H.: Selective and reversible inhibition of proliferation and influence on metabolic function in L-cells by low cortisol concentrations. Acta endocr. 53, 189 (1966)

45.STACKHOUSE, H.L., CHETSANGA, C.J., TAN.,C.H.: Biochem. biophys. Acta (Amst.) 155, 159 (1968)

46.STRAUSZ, J., KEKES,E., SZEBENI,A.: Mechanism of prednisolone induces leucocytosis in man. Acta haemat. (Basel) 33,40 (1965)

47.SWINGLE, W.W. und J.J.PFIFFNER, Amer. J. Physiol. 96.164 (1931) 96.180 (1931) 96,144 (1931)

48.SWINGLE, W.W., Amer. Naturalist 41,132 (1927)

49.TAIFOUR, A.-H.: Autoradiographische Untersuchungen an Glucocorticoid-vorbehandelten Mäusefibroblasten-Kulturen. Diss. (Heidelberg 1968)

50.TAUSK, M.: Pharmakologie der Hormone Thieme, Stuttgart 1970)

51.THOMAS, K., E.SEIDLER: Knochenmark in vitro unter dem Einfluß cytostatischer und hormoneller Substanzen.
Folia haemat. N.F., 4 : 2 (1960)

52.TORMEY, D.C., H.H.FUDENBERG, R.M. KAMIN: Effects of prednisolone on synthesis of DNA and RNA by human lymphocytes in vitro.
Nature 213 : 281 / 1967

53.TROWELL, O.A.: The action of cortison on lymphocytes in vitro.
J. Physiol., Lond. 119 : 274 (1953)

54.UNDRICOV, M.I., W.B.ROZEN, L.S.CHERNIN: Rolle der Glucocorticoid-Hormone in der Pathogenese des experimentellen Rheumatismus.
Vopr. reumat., Moskva, No 1, 4, 7 (1964)

55.VERZAR, F. : Die Funktion der Nebennierenrinde
Basel Benno Schwabe & Co - Verlag

56.WELLINGTON, J.S., MOON, H.D.: Effect of hydrocortisone on human cells in tissue culture.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 107,556 (1961)

57.WEISSENFELS, J. und BOLL,I.: Einwirkung von Corticosteroiden (Prednisolonacetat u. Triamcinolon) auf menschliches Knochenmark in vitro.
Klin. Wschr. 51, 907 - 914 (1973)

58.WILDE, G.: Die Einwirkung von Dexamethasonsulfat auf menschliches Knochenmark in vitro.
Diss. (Berlin 1974)

# L E B E N S L A U F

Am 12. April 1948 wurde ich, Clemens Glöckler, als Kind des Kaufmanns Georg Glöckler und seiner Ehefrau Christel, geb. Brüß, in Berlin geboren.

Im Frühjahr 1954 wurde ich eingeschult. Am 12. Februar 1969 legte ich am Rheingau-Gymnasium in Berlin-Friedenau meine Reifeprüfung ab.
Nach dem Schulabschluß bewarb ich mich an der Freien Universität Berlin für das Studium der Humanmedizin und wurde am 14. November 1969 immatrikuliert. Die ärztliche Prüfung legte ich am 23.2.1976 ab

Ab 1. Juni 1976 bin ich als Medizinalassistent im Wenckebach-Krankenhaus tätig.